

Aus der Forschung Pharma der Schering AG.
Berlin/Bergkamen

Diabetogene Wirkung von Streptozotocin bei Mäusen, Ratten, chinesischen Streifenhamstern, Meerschweinchen und Kaninchen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

■

1971

vorgelegt von Andrad Rilke aus Berlin

■

Aus der Forschung Pharma der Schering AG.
Berlin/Bergkamen

Diabetogene Wirkung von Streptozotocin bei Mäusen, Ratten, chinesischen Streifenhamstern, Meerschweinchen und Kaninchen.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den
Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Andrad Rilke aus Berlin

Referent: Professor Dr. med. Martin Kramer

Korreferent: Professor Dr. med. Volker Becker



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 2.3.1971

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
2.	Methodik	15
2.1.	Tiermaterial	16
2.2.	Substanzen und ihre Lösung	17
--1.	Streptozotocin	—
--2.	Glymidin-Na	—
--3.	^{14}C -U-Glucose	—
2.3	Applikation und Dosierung von Streptozotocin	18
2.4.	Blutuntersuchung	19
--1.	Blut- und Serumgewinnung	—
--2.	Biochemische Methoden	20
---1.	Glucosebestimmung im Blut	—
---2.	Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum	—
---3.	Radioimmunologische Insulinbestimmung	21
----1.	Prinzip	—
----2.	Technische Durchführung	—
2.5	Bestimmung der Oxydation ^{14}C markierter Glucose zu $^{14}\text{CO}_2$ in der Ausatemungsluft	22
2.6	Organuntersuchungen	23
--1.	Bestimmung der Glucose-6-Phosphatase in der Leber	—
--2.	Histologie der Bauchspeicheldrüse	24
2.7.	Statistik	25
3.	Ergebnisse	27
3.1.	Versuche an Mäusen	28
--1.	Einfluß von Streptozotocin auf die Blutzuckerkonzentration	—
--2.	Insulininkretion	29
--3.	Schlußfolgerung	30
3.2.	Versuche an Ratten	—
--1.	Experimente zur Charakterisierung des Streptozotocin-Diabetes	—
---1.	Glucosekonzentration im Blut	—
---2.	Insulininkretion	32
---3.	Konzentration der freien Fettsäuren im Serum	34
---4.	Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber	35
---5.	Intravenöse Glucosetoleranz und Glucoseoxydation	36
---6.	Histologie der Bauchspeicheldrüse	38
---7.	Schlußfolgerung	39
--2.	Zeitlicher Ablauf und Dosisabhängigkeit der Streptozotocinwirkung	—
---1.	Blutzuckerkonzentration	—
----1.	Veränderungen innerhalb der ersten 5 Stunden	41
----2.	Veränderungen nach 48 Stunden	43
---2.	Insulininkretion	44
---3.	Freie Fettsäuren im Serum	44
---4.	Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber	45
---5.	Schlußfolgerung	—
3.3.	Experimente an chinesischen Streifenhamstern	47
--1.	Blutzuckerkonzentration	—
--2.	Insulininkretion	49
--3.	Freie Fettsäuren im Serum	51
--4.	Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber	—
--5.	Histologische Untersuchung des Pankreas	53

— 6.	Schlußfolgerung	55
3.4.	Untersuchungen an Meerschweinchen	56
— 1.	Injektion von Streptozotocin bei nüchternen Tieren	—
— 2.	Injektion von Streptozotocin nach vorheriger Behandlung mit Insulin	58
— — 1.	Blutzuckerkonzentration	—
— — 2.	Freie Fettsäuren im Serum	60
— — 3.	Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Leber	61
— — 4.	Histologische Untersuchung der Bauchspeicheldrüse	63
— — 5.	Schlußfolgerung	65
3.5.	Stichversuch an Kaninchen	66
4.	Diskussion	69
5.	Zusammenfassung	75
6.	Literaturverzeichnis	79

1. EINLEITUNG

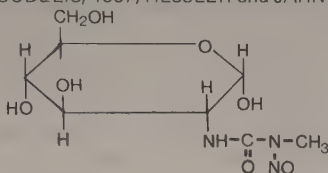
Seit der rein zufälligen Entdeckung der blutzuckersteigernden Wirkung von Alloxan durch JACOBS (1937) und der von DUNN, SHEEHAN und McLEITCHIE (1943) beschriebenen Zerstörung der B-Zellen in den Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse wird diese Substanz zur Erzeugung eines experimentellen Diabetes mellitus bei zahlreichen Arten von Laboratoriumstieren verwendet. Hierzu gehören Hunde, Kaninchen, Ratten, syrische Goldhamster, Mäuse, Katzen, Rhesusaffen, Tauben. Es gelingt zwar, mit dieser Verbindung einen Insulinmangel mit allen sich daraus für den Stoffwechsel ergebenden Konsequenzen zu erzeugen, die Anwendung von Alloxan ist aber mit zwei wesentlichen Nachteilen verbunden: Die Verbindung ist relativ toxisch und außerdem bei verschiedenen Tierarten unwirksam.

Eine Reihe von Untersuchungen, die vor allem an Ratten und Hunden durchgeführt wurden, hat ergeben, daß die für die Zerstörung der B-Zellen notwendigen Dosen auch die Zellen aller anderen Gewebe schädigen (FRERICHS und CREUTZFELDT, 1969). Insbesondere kommt es unabhängig von der Dauer und dem Schweregrad des Diabetes zu frühzeitigen Leber- und Nierenschäden. In der Leber sind sie charakterisiert durch fleckförmige Verfettung und einzelne oder herdförmige Nekrosen (LAZAROW und PALAY, 1946; CREUTZFELDT, 1949; HOUSE, 1958). In der Niere werden vorwiegend die Epithelien der Tubuli geschädigt, es kommt zu trüber Schwellung mit Vakuolisierung und Tubulusnekrosen (DUFF, 1945; LUKENS, 1948). In Abhängigkeit vom Schweregrad dieser Veränderungen stirbt ein relativ großer Prozentsatz der mit Alloxan behandelten Tiere innerhalb der ersten Tage nach intravenöser Injektion der Substanz, bei den überlebenden Tieren dauert es ca. zwei bis drei Wochen bis die Regeneration in den toxisch geschädigten Organen erfolgt ist. Aus diesen Gründen ist es nicht angebracht, Versuche an alloxandiabetischen Tieren innerhalb der ersten vierzehn Tage durchzuführen, obwohl bereits nach vierundzwanzig Stunden die Zeichen eines manifesten Diabetes mellitus bestehen. Um Tiere während dieser Zeit am Leben zu erhalten, ist eine Substitution mit Insulin erforderlich. STEINER, RAUDA und WILLIAMS (1961) empfehlen sogar, einen Zeitraum von sechs Wochen zwischen der Alloxaninjektion und der Verwendung der Tiere zu Versuchszwecken einzuhalten. Als Nachteil ist weiterhin anzusehen, daß einige Species gegenüber Alloxan resistent sind. Dies gilt für Meerschweinchen (FRERICHS und CREUTZFELDT, 1969, siehe dort weitere Literatur) und chinesischen Streifenhamster, zwei in der Diabetesforschung häufig verwendeten Tierarten (LOGE, 1970).

So stellen Meerschweinchen ein wichtiges Modell zum Studium der Wirkung von Biguaniden dar, da bereits die Applikation niedriger Dosen dieser Substanzklasse eine erhebliche Senkung der Blutzuckerkonzentration herbeiführt (BECKMANN, 1968). Chinesische Streifenhamster spielen bei der Grundlagenforschung des Diabetes mellitus eine wesentliche Rolle, da bei dieser Tierart eine spontan genetisch bedingte Stoffwechselstörung auftritt, die in vielen Symptomen dem juvenilen Diabetes des Menschen ähnelt (MEIER und YERGANIAN, 1961; BUTLER, 1967; SIMS und LANDAU, 1967; CARPENTER, GERRITSEN, DULIN und LAZAROW, 1967; GERRITSEN und DULIN, 1967; MALAISSE, MALAISSE-LAGAE, GERRITSEN, DULIN und WRIGHT, 1967; LOSERT, LOGE und RICHTER, 1970).

Zur Untersuchung von Ursachen und Folgen der B-Zelldegeneration bei diesen Tieren ist ein Vergleich zwischen spontan-diabetischen und experimentell-diabetischen Tieren von großem Interesse. In gleicher Weise wie auch bei den Meerschweinchen ist es bei den chinesischen Streifenhamstern unmöglich, durch Injektion nicht letal wirkender Alloxandosen eine dauernde irreversible Zerstörung des Inselnsystems zu erreichen. Die schädigende Wirkung ist bei Meerschweinchen und chinesischen Streifenhamstern sichtlich noch weniger spezifisch gegen die B-Zellen gerichtet als bei den Tierarten, die nach Injektion von Alloxan einen Diabetes mellitus entwickeln.

Im Gegensatz dazu soll eine neue Verbindung, deren beta-zytotoxische Wirkung erst vor kurzem entdeckt wurde, eine hochgradige selektive Affinität zu diesen Zellen besitzen. Es handelt sich hierbei um Streptozotocin, ein Antibiotikum, das zunächst aus *Streptomyces acromogenes* extrahiert (HERR, EBLE, BERGY und JAHNKE, 1960) und nach Aufklärung der Struktur synthetisiert wurde (HERR, JAHNKE und ARGOUEDELIS, 1967; HESSLER und JAHNKE, 1970).



STREPTOZOTOCIN

($\text{C}_8\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_7$)

Ein diabetogener Effekt von Streptozotocin wurde erstmals von RAKIETEN und NADKARNI (1963) an Ratten und Hunden beschrieben. Bei Screening-Untersuchungen stellte sich außerdem heraus, daß die Verbindung neben antibakteriellen (VAVRA, De BOER, DIETZ, HANKA und SOKOLSKI, 1960; LEWIS und BARBIERS, 1960; WHITE, 1963) sowohl zytostatische (WHITE, 1963; EVANS, GERRITSEN, MANN und OWEN, 1965; SCHEIN, COONEY und VERNON, 1967) als auch tumor erzeugende Eigenschaften besitzt (ARISON und FEUDALE, 1967). In der Folgezeit ist es gelungen, außer an Hunden und Ratten (RAKIETEN, RAKIETEN und NADKARNI, 1963) auch an Mäusen (EVANS, GERRITSEN, MANN und OWEN, 1965; SCHEIN, COONEY und VERNON, 1967; LOGOTHETOPOULOS und BROSKY, 1968; BROSKY und LOGOTHETOPOULOS, 1969), Hamstern (LITTLE, 1966) und Rhesusaffen (PITKIN und REYNOLDS, 1970) einen Diabetes mellitus zu erzeugen. Dagegen war es bisher nicht möglich, bei Kaninchen eine gleiche Wirkung zu erzielen (KUSHNER, LAZAR, FURMAN, LIEBERMAN und LEOPOLD, 1969). Unterschiedliche Beobachtungen über den diabetogenen Effekt von Streptozotocin wurden bei Meerschweinchen mitgeteilt. KUSHNER, LAZAR, FURMAN, LIEBERMAN und LEOPOLD (1969) konnten bei dieser Tierart keine diabetische Stoffwechsellaage mit dem Antibiotikum hervorgerufen. Dagegen kam es nach den Untersuchungen von BROSKY und LOGOTHETOPOULOS (1969) zu einer dauerhaften Hyperglykämie, wenn die Verbindung nach vorheriger Erzeugung einer Hypoglykämie intravenös injiziert wurde.

Histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Ratten, die von RAKIETEN, RAKIETEN und NADKARNI (1963) und ARISON, CIACCIO, GLITZER, CASSARO und PRUSS (1967) und von JUNOD, LAMBERT, ORCI, PICTET, GONET und RENOLD (1967) sowie an Meerschweinchen und Mäusen von BROSKY und LOGOTHETOPOULOS (1969) vorgenommen wurden, haben gezeigt, daß Streptozotocin an den B-Zellen der Langerhansschen Inseln zu degenerativen Veränderungen unterschiedlichen Ausmaßes von der Degranulierung bis zur Nekrose führt. Schädigungen der A-Zellen wurden nicht beobachtet (JUNOD, LAMBERT, ORCI, PICTET, GONET und RENOLD, 1967; BROSKY und LOGOTHETOPOULOS, 1969), auch das exokrine Pankreas blieb intakt (JUNOD, LAMBERT, ORCI, PICTET, GONET und RENOLD, 1967), lediglich in einigen Fällen waren Veränderungen an diesem Teil der Bauchspeicheldrüse erkennbar, wenn höhere Dosen (100 mg/kg) injiziert wurden als zur Erzeugung eines Diabetes mellitus erforderlich sind (ARISON, CIACCIO, GLITZER, CASSARO und PRUSS, 1967). In der Leber, Niere und anderem Gewebe wurden keine größeren, akuten toxischen Veränderungen festgestellt, lediglich in den ersten sechsunddreißig Stunden nach intravenöser Injektion der Substanz traten einzelne herdförmige Nekrosen auf. Bei längerer Dauer des Diabetes mellitus wurden allerdings Komplikationen (Katarakt, Glykogeneinlagerung in proximale Nierentubuli) beobachtet, die als Folgen einer länger anhaltenden Hyperglykämie und Hyperlipämie erwartet werden konnten (ARISON, CIACCIO, GLITZER, CASSARO und PRUSS, 1967; JUNOD, LAMBERT, ORCI, PICTET, GONET und RENOLD, 1967). Aufgrund dieser außerordentlich hohen Spezifität des Streptozotocin-

effektes wurde die Verbindung am Menschen mit Erfolg zur Behandlung von Inselzellcarcinomen verwendet (MURRAY-LYON, EDDLESTON, WILLIAMS, BROWN, HOGGIN, BENNET, EDWARDS und TAYLOR, 1968; SADOFF, 1969).

Als weiterer Vorteil gegenüber Alloxan kann angesehen werden, daß die Regenerationstendenz des zerstörten B-Zellsystems nach Injektion von Streptozotocin gering ist (JUNOD, LAMBERT, STAUFFACHER und RENOLD, 1969). Selbst nach Gabe geringer Dosen, die einen leichten Diabetes zur Folge hatten, kam es innerhalb von achtundzwanzig Tagen bei Ratten nicht zu einer Verminderung der Hyperglykämie und zum Anstieg des herabgesetzten Insulingehaltes der Bauchspeicheldrüse (JUNOD, LAMBERT, STAUFFACHER und RENOLD, 1969). Die mitotische Aktivität von B-Zellen des Mäusepancreas, die den zytotoxischen Effekt überlebt hatten, war nach Gabe von Streptozotocin geringer als nach Injektion von Alloxan (LOGOTHETOPOULOS und BROSKY, 1968).

Noch in anderer Hinsicht scheint Streptozotocin dem Alloxan überlegen zu sein. Untersuchungen von HAACKE (1969) sowie von JUNOD, LAMBERT, STAUFFACHER und RENOLD (1969) zeigen, daß der Schweregrad des Diabetes mellitus von der injizierten Streptozotocinmenge abhängig ist. Dies wurde an Hand von dosisabhängigen Veränderungen der Blutzuckerkonzentration sowie des Insulingehaltes im Serum und in der Bauchspeicheldrüse gemessen.

Von diesen unter unterschiedlichen Bedingungen erhobenen Befunden ausgehend wurde in vergleichenden Versuchen geprüft, ob Streptozotocin zur routinemäßigen Erzeugung eines experimentellen Diabetes mellitus bei den in der Diabetesforschung häufig verwendeten Laboratoriumstieren geeignet ist. Zu diesem Zweck wurden Experimente an Mäusen, Ratten, chinesischen Streifenhamstern und Meerschweinchen durchgeführt. Außerdem sollte im Rahmen eines Stichversuches — bedingt durch den Mangel an ausreichenden Substanzmengen — der diabetogene Effekt von Streptozotocin auch an einem Kaninchen geprüft werden. Ziel dieser Versuche war es, Bedingungen zu ermitteln, unter denen bei diesen Tierarten ein definiertes diabetisches Syndrom sicher erzeugt werden kann. Zur Charakterisierung des Streptozotocineffektes dienten außer der histologischen Untersuchung der Bauchspeicheldrüsen vor allem der biochemische Nachweis eines Insulinmangels mit den sich daraus für den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel ergebenden Folgen.

Die wesentlichen Stoffwechseleffekte des Insulins bestehen in einer Steigerung der zellulären Glucoseaufnahme und damit auch Oxydation in der Skelett- und Herzmuskulatur (COLOWICK, CORI und SLEIN, 1947; LEVINE, GOLDSTEIN, KLEIN und HUDDLESTON, 1949; LEVINE und GOLDSTEIN, 1955; HENDERSON, MORGAN und PARK, 1961; PARK, REGEN und MORGAN, 1963) sowie im Fettgewebe (CROFFORD und RENOLD, 1965), einer Hemmung der Lipolyse im Fettgewebe (ENGEL und WHITE, 1960; CAHILL, LEBOEUF und FLINN, 1960; JUNGAS und BALL, 1963; MAHLER, STAFFORD, TARRANT und ASHMORE, 1964; FAIN, KOVACEV und SCOW, 1966) und in einer Verminderung der Glucoseabgabe aus der Leber (COLLENS und MURLIN, 1928/29; WEISBERG, FRIEDMAN und LEVINE, 1949; DUNN, FRIEDMANN, MAASS, REICHARD und WEINHOUSE, 1957; REICHARD, JACOBS, FRIEDMANN, KIMBEL, HOCHILLA und WEINHOUSE, 1959; WEINHOUSE, FRIEDMANN und REICHARD, 1963; KALANT, CSORBA und HELLER, 1963; STEELE, BISHOP, DUNN, ALTSZULER, RATHGEB und DEBODO, 1965). Hierfür ist die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase von ausschlaggebender Bedeutung. Dieses Schlüsselenzym der Gluconeogenese wird durch Glucocorticoide induziert, während Insulin als Suppressor wirkt und die Umsatzgeschwindigkeit herabsetzt (WEBER 1963; WEBER, SINGHAL, STAMM, FISHER und MENTENDIEK, 1964; WEBER, 1965).

Zur Beurteilung des Schweregrades der diabetischen Stoffwechselstörung wurden daher die Konzentrationen des radioimmunologisch meßbaren Insulins im Serum und ihre Beeinflussung durch Glucose oder Glymidin-Na (Glykodiazin, Redul[®]), die Blutzuckerkonzentrationen im nüchternen Zustand und nach intravenöser oder oraler Gabe von Glucose, der Gehalt der freien Fettsäuren im Serum, die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Leber und die Oxydation von ^{14}C markierter Glucose zu $^{14}\text{CO}_2$ bestimmt.

2. METHODIK

2.1. Tiermaterial

Die Versuche wurden an Mäusen, Ratten, chinesischen Streifenhamstern, Meerschweinchen und Kaninchen durchgeführt. Stamm, Geschlecht und Körpergewicht der Tiere, Angaben über die Ernährung und den Züchter der einzelnen Tierspecies sind in folgender Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tierart	Stamm	Geschlecht	Gewicht (g)	Züchter	Futter
Mäuse	NMRI (konventionell)	♂	20- 25	Schering	Sniff-Plange
Ratten	Sprague Dawley (konventionell)	♂	80-120	Wulf	Altromin R
chinesische Streifenhamster	Stoffwechsel gesunde Tiere	♂ ♀	30- 50	Schering	Frischfutter (Frischgemüse, Sonnen- blumenkerne, Haferflocken)
Meerschweinchen	Pearl-White (konventionell)	♀	200-300	Wauschkuhn	Altromin MS Frischfutter
infantile Kaninchen	weiße Neuseeländer	♀	400-600	Scheeler u. Herbers	Altromin K

Tabelle 1

Als Trinkflüssigkeit erhielten die Tiere Leitungswasser ad libitum.

2.2.

SUBSTANZEN UND IHRE LÖSUNG

2.2.1.

Streptozotocin* (Upjohn Comp., Kalamazoo, Michigan USA) wurde entsprechend den Empfehlungen der Herstellerfirma in physiologischer Kochsalzlösung gelöst, innerhalb einer Minute mit 0,01 M Zitronensäure auf pH 4,5 eingestellt und im Verlauf weiterer fünf Minuten appliziert. Eine Verschiebung des pH Wertes in den neutralen Bereich verursacht Inaktivität der Substanz.

2.2.2.

Glymidin-Na (Glykodiazin, Redul[®]) wurde zur intravenösen Applikation in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

2.2.3.

¹⁴C-U-Glucose (Radiochemical Centre, Amersham, England) wurde in einer Konzentration von 2-4 μ Ci/ μ mol geliefert, zusammen mit inaktiver Glucose in dest. Wasser gelöst und in einer Dosis von 13,33 μ Ci/kg (= 1,5 g/kg Glucose) intravenös injiziert.

Die applizierten Volumina betrugen bei allen Tierarten jeweils 5 ml/kg, unbehandelte Kontrolltiere erhielten eine gleiche Menge physiologische Kochsalzlösung.

* Herrn Dr. Dulin danke ich für die Überlassung des Streptozotocins, das er auf Anfrage von Herrn Dr. Losert (Schering) zur Verfügung gestellt hatte.

2.3.

APPLIKATION UND DOSIERUNG VON STREPTOZOTOCIN

Im allgemeinen wurde die Substanz sechzehn Stunden nüchternen Tieren intravenös injiziert. In Anlehnung an die Veröffentlichung von BROSKY und LOGOTHETOPOULOS (1969) wurden außerdem Experimente an Meer-schweinchen und Kaninchen durchgeführt, bei denen Streptozotocin nach Erzeugung eines hypoglykämischen Schocks (Insulin) appliziert wurde. Einzelheiten über Dosis und Injektionstechnik sowie die Vorbereitung der Tierarten zum Versuch ergeben sich aus Tabelle 2. Nach Injektion der Substanz erhielten die Tiere Futter, in einigen Fällen wurde Glucose verabreicht.

Tierart	Dosierungen (mg/kg)	Ort der intravenösen Injektion	Insulinschock Zeit u. erforderliche Dosis	Futterentzug
Mäuse	75, 200, 300	Schwanz-vene	—	16 Stunden
Ratten	20, 40, 60, 75, 80, 150	Schwanz-vene	—	16 Stunden
chinesische Streifenhamster	75, 300	v.femoralis	—	16 Stunden , Einzelkäftige
Meer-schweinchen	50, 75, 90, 100, 200	Vorderarm-vene	—	16 Stunden
	150	Vorderarm-vene	15-20IE Alt-insulin s.c., 2 Stunden	20 Stunden
infantile Kaninchen	150	Ohrvene	100IE Alt-i.v., 1 Stunde	20 Stunden

Tabelle 2

2.4. BLUTUNTERSUCHUNG

2.4.1. Blut- und Serumgewinnung

Bei kleinen Laboratoriumstieren ist es schwierig, in kurzen Zeitabständen mehrere Blutentnahmen am gleichen Tier durchzuführen. Schon bei einer geringen Verminderung des Blutvolumens kommt es zu einer Steigerung der Glucosekonzentration im Blut, die mit einer Catecholaminfreisetzung erklärt werden kann. Deshalb wurde bei Mäusen, in einigen Fällen auch bei chinesischen Streifenhamstern, mit einem großen Kollektiv gearbeitet und jeweils zu einer bestimmten Zeit eine Blutentnahme durch Dekapitation vorgenommen. Bei Ratten, Meerschweinchen und, sofern die Abnahmen nicht zu häufig erfolgen, auch bei chinesischen Streifenhamstern, ist es möglich nach dem Verfahren von HALPERN und PACAUD (1951), mehrfach am gleichen Tier Blut mit einer spitz ausgezogenen, scharf angeschliffenen Glaspipette durch Punktion des retrobulbären Venenplexus zu entnehmen. Bei Kaninchen kann man mehrfach Blut durch Punktion einer Ohr- randvene gewinnen. Eine Übersicht hierüber wird in Tabelle 3 gegeben.

Tierart	Blutentnahme durch		
	Dekapitation	Punktion des retrobulbären Venenplexus	Punktion der Ohr randvene
Mäuse	+	—	—
Ratten	+	+	—
chinesische Streifenhamster	+	+	—
Meerschweinchen	—	+	—
infantile Kaninchen	—	—	+

Tabelle 3

Zur Gewinnung von Serum wurde Blut in Zentrifugengläsern aufgefangen, der spontanen Gerinnung überlassen und 3 min bei 3000 Upm (Zimmertemperatur) zentrifugiert.

2.4.2. Biochemische Methoden

2.4.2.1. Glucosebestimmung im Blut

0,1 ml Vollblut wurde unter Zusatz von 1,0 ml Uranylacetat-Lösung enteiweißt. Nach Zentrifugation 3000 Upm/min wurden im klaren Überstand die Glucosekonzentration in Anlehnung an die von HUGGETT und NIXON (1957) publizierten Methode bestimmt (Testkombination Biochemica, Boehringer Mannheim G.m.b.H.).

Grundlage hierfür ist die Oxydation der Glucose in Gegenwart von Luftsauerstoff durch das Enzym Glucoseoxydase. Hierbei entsteht zugleich stöchiometrisch Wasserstoffperoxyd, das bei Anwesenheit des Wasserstoffdonators o-Dianisidinhydrochlorid und des katalysierenden Enzyms Peroxydase in H_2O übergeführt wird. Das o-Dianisidinhydrochlorid wird dabei zu einem rotbraun gefärbten Chinon oxydiert, das Licht bei 436 m μ absorbiert und damit der photometrischen Bestimmung zugänglich ist.

Nach dem von der Firma Boehringer modifizierten Blutzucker-Testverfahren wurden die beiden Enzyme zusammen mit einer Puffersubstanz in dest. Wasser gelöst und kurz vor der Verwendung das Chromogen hinzugegeben. Von dieser Puffer-Enzym-Chromogenlösung wurden 5,0 ml zu 0,2 ml des enteiweißten Überstandes hinzupipettiert. 35 min später wurde die Intensität des entstandenen Farbstoffes mit einem Spectrophotometer der Firma Beckmann (Modell DB) gemessen. Unter Berücksichtigung eines Leerwertes und eines Standards (entsprechend einer Blutzuckerkonzentration von 100 mg%) wurde der Glucosegehalt der untersuchten Blutproben errechnet.

2.4.2.2. Bestimmung der freien Fettsäuren im Serum

Die Messung der Konzentration freier Fettsäuren im Serum erfolgte nach der Methode von DUNCOMBE (1963).

Freie Fettsäuren bilden mit Kupfer Salze, die in Wasser praktisch unlöslich, in dem organischen Lösungsmittel Chloroform aber löslich sind. Mit substituierten Carbaminaten (Diäthyl-dithiocarbamat) gehen Schwermetallsalze von Fettsäuren gelb gefärbte Komplexe ein, deren Farbintensität in Abhängigkeit zur Konzentration steht. Das Absorptionsmaximum liegt bei 440 m μ .

Zur Durchführung wurden aus einer Bürette 6,0 ml Chloroform in ein 10,0 ml fassendes Schliffzentrifugenglas vorgelegt und anschließend 2,0 ml Phosphatpuffer (0,1 M, pH 6,2) und 0,2 ml Serum hinzupipettiert. Danach wurde 10 min geschüttelt und nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation mit einer an einem Vakuum angeschlossenen Kapillare die obere Phase einschließlich des Eiweißschlammes abgesaugt. Der zurückbleibenden Chloroformphase wurden 2,0 ml einer Lösung hinzugefügt, die aus 10 Vol. 6,45%iger $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$, 9 Vol. 1 M Triäthanolamin-Lösung und 1 Vol. 1 N Essigsäure bestand. Erneut wurde 10 min geschüttelt und nach Phasentrennung (Zentrifugation 3000 Upm, 10 min) die wäßrige Phase abgesaugt. Zur Entfernung des restlichen Wassers wurde das zurückbleibende Chloroform in ein Reagenzglas filtriert (Faltenfilter Selectra Nr. 595 1/2, $\varnothing$ 7 cm). Je 3,0 ml Filtrat (entsprechend 0,1 ml Serum) wurden anschließend in Reagenzgläser pipettiert und mit 1,0 ml 0,1%iger Diäthyl-dithiocarbamat-Lösung in Alkohol versetzt. Nach Umschütteln bildete sich ein braungelber Farbstoff, dessen Intensität gegen einen entsprechenden Reagentien-leerwert bei 440 m μ in einem Spectrophotometer der Firma Beckmann

(Modell DB) gemessen wurde. In gleicher Weise wie die Meßproben wurde ein Palmitinsäurestandard behandelt, der in 6,0 ml Chloroform vorgelegt wurde. Er enthielt 0,2 μ mol Palmitinsäure und damit 0,2 ml eines Serums mit der Konzentration von 1,0 mval/l. Durch Vergleich zwischen Meßwert und Standard konnte die Fettsäurekonzentration im Serum in mval/l angegeben werden.

2.4.2.3.

Radioimmunologische Insulinbestimmung im Serum

Die Konzentration dieses Hormons im Serum wurde entsprechend den Angaben von MORGAN und LAZAROW (1962, 1963) sowie MORGAN, LAZAROW und SORENSON (1964) gemessen.

2.4.2.3.1.

Das Prinzip der radioimmunologischen Insulinbestimmung nach der Doppelantikörpermethode beruht auf einer Bindung des Hormons an einen spezifischen Antikörper und nachfolgender Trennung des gebundenen und freien Insulins durch eine zweite Immunreaktion, bei der der Antigen-Antikörperkomplex durch einen gegen das Insulinantiserum gerichteten zweiten Antikörper präzipitiert wird. Für dieses System ist eine definierte Menge ^{125}J -Insulin erforderlich, dessen Bindung an den Antikörper mit dem Gehalt an unmarkiertem Hormon konkurriert, so daß bei steigenden Konzentrationen freien Insulins weniger radioaktives Hormon gebunden wird und umgekehrt. Die Herstellung der Insulinantikörper gelingt durch Immunisierung von Meerschweinchen mit kristallinem Rinderinsulin (Hoechst). Antiserum zur Präzipitation des löslichen Antigen-Antikörperkomplexes wird durch Immunisierung von Kaninchen gegen Meerschweinchenserum gewonnen.

Da Mäuse, Ratten und Hamsterinsulin mit Antikörpern reagiert, die spezifisch gegen Rinderinsulin gerichtet sind, ist es möglich, die Insuline dieser Tierarten unter Verwendung von ^{125}J -Rinderinsulin, einem Antirinderinsulinserum und kristallinem Rinderinsulin als Eichsubstanz zu bestimmen. Meerschweincheninsulin kann mit dieser Methode nicht bestimmt werden, da es bisher nicht gelungen ist, einen gegen dieses Hormon gerichteten Antikörper zu erzeugen.

2.4.2.3.2.

Technische Durchführung

Die zur Insulinmessung vorgesehenen Serumproben, jeweils zweimal 0,1 ml zur Doppelbestimmung, wurden bis zur Aufarbeitung bei -20°C in 7,0 ml Plastikzentrifugenbechern aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden im Eisbad folgende Reagentien hinzugegeben: 0,4 ml 5%iger Rinderserumalbuminboratpuffer¹ 0,05 ml ^{125}J -Insulinlösung (2,7 μE Insulin, 5 nCi ^{125}J)², 0,05 ml Insulinantiserum³. Ebenso wurden gleiche Volumina einer Rinderinsulineichreihe behandelt, deren Konzentration von 0 bis 512 $\mu\text{E/ml}$ reichte. Nach guter Durchmischung wurden die Proben 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurde in der Kälte 0,05 ml Antimeerschweinchenserum⁴ (eigene Herstellung) und 0,05 ml normales Meerschweinchenserum⁵ hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 16-24 Stunden bei 4°C war ein Präzipitat entstanden, das den Insulin-Antiinsulin-komplex enthielt. Der Überstand wurde abzentrifugiert (3000 Upm/min, Zimmertemperatur) und dekantiert. Das Präzipitat wurde anschließend mit 0,5 ml 1%igem Rinderserumalbuminboratpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Wasch-

flüssigkeit wurde dem Überstand hinzugefügt. Die Radioaktivität von Präzipitat und Überstand wurde in einem Auto- γ -Szintillationszähler der Firma Nuclear Chicago gemessen und der im Präzipitat enthaltene Anteil als Prozentsatz der Gesamtaktivität errechnet. Durch Auftragen der gebundenen Radioaktivität der Eichwerte gegenüber der bekannten Insulinkonzentration ergab sich auf semi-logarithmischem Papier eine Eichkurve, von der der Insulingehalt der Versuchsproben abgelesen werden konnte. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 5 wurde die Konzentration des immunoreaktiven Insulins in $\mu\text{E/ml}$ angegeben.

- ¹ 8,25 g Borsäure, 2,7 g NaOH, 100 mg Thimerosal (Merthiolat), 50,0 g Rinderserumalbumin (reinst), aqua dest. ad 1000,0, pH 7,4.
- ² 125-J-Rinderinsulin (0,1 μg = 2,7 mE, 5 μCi , 5 ml, Radiochemical Centre, Amersham, England), 10fache Verdünnung mit 5%igem Rinderserumalbuminboratpuffer.
- ³ Antirinderinsulin- γ Globulin vom Meerschweinchen (eigene Herstellung), Verdünnung 1:6000 mit 5%igem Rinderserumalbuminboratpuffer unter Zusatz von 5,4% EDTA.
- ⁴ Präzipitierendes Antimeerschweinchenserum vom Kaninchen, eigene Herstellung, unverdünnt.
- ⁵ Normales Meerschweinchenserum, 1:200 mit 5%igem Rinderserumalbuminboratpuffer verdünnt.

2.5.

BESTIMMUNG DER OXYDATION ^{14}C MARKIERTER GLUCOSE ZU $^{14}\text{CO}_2$ IN DER AUSATMUNGSLUFT

Diese Versuche wurden nur an Ratten durchgeführt. Die Messung der Glucose-oxydation zu CO_2 erfolgte unter den Bedingungen einer intravenösen Glucose-toleranzprüfung. 5 Minuten nach intravenöser Injektion von 1,5 g/kg Glucose (= 13,33 μCi ^{14}C -U-Glucose/kg) erfolgte eine Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus zur Blutzuckerbestimmung. Anschließend wurde bis zur 22. Minute nach Injektion der Aktivität die mit der Atemluft abgegebene radioaktive Kohlensäure gesammelt. Danach wurde erneut Blut zur Glucosebestimmung entnommen und aus dem Abfall des Blutzuckers die Eliminationskonstante k_G berechnet. Vorversuche hatten ergeben, daß während dieser Zeit die Blutzuckerkurve exponentiell, d.h. nach Auftragung auf semilogarithmisches Papier linear, abfällt.

Zur Fixierung der $^{14}\text{CO}_2$ wurden die Tiere in verschlossene Glasgefäße (Witt'sche Töpfe) gesetzt, die mit Luft 1,5-2 l/min durchströmt wurden. Die abgesaugte Luft wurde durch Gaswaschflaschen geleitet, in denen sich 100,0 ml einer 12%igen Äthanolaminlösung in Methanol befanden. Nach Ersatz des verdunsteten Methanols wurde die in jeweils 4,0 ml Lösung enthaltene Radioaktivität mit Hilfe eines Flüssigkeitszintillationszählers gemessen. Unter Berücksichtigung des Volumens, der Zählausbeute und des Körpergewichtes wurde die Aktivität der ausgeatmeten CO_2 in der Dimension dpm/kg errechnet.

2.6. ORGANUNTERSUCHUNGEN

26.1. Bestimmung der Glucose-6-Phosphatase in der Leber

Die Aktivität dieses Enzyms wurde nach den Angaben von HARPER (1962) bestimmt.

Die Methode beruht auf der enzymatischen Spaltung von Glucose-6-Phosphat und nachfolgender Bestimmung des dabei entstehenden anorganischen Phosphats.

Zur Gewinnung von Lebergewebe wurden die Tiere durch Dekapitation getötet. Der rechte Leberlappen wurde nach Eröffnung des Bauchraumes sofort entnommen, von Blutresten befreit, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C aufbewahrt. Am Tage der Messung wurden 200-300 mg gefrorenes Gewebe mit 10,0 ml Maleatpuffer (0,1 M, pH 6,5) mit einem Teflonhomogenisator (Modell: Potter-Elvehjem) 1 min lang im Eisbad homogenisiert. Das Homogenat wurde 30 min in einer Sorvall-Kühlzentrifuge bei 0°C und 10 000-g abgefahren. 0,5 ml des Überstandes wurden 15 min lang im Wasserbad bei 37°C mit 0,5 ml Glucose-6-Phosphatlösung (als Di-Na^{+} -Salz, 0,08 M in Maleatpuffer gelöst) inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Hinzufügen von 4,0 ml 11,36%iger Trichloressigsäure beendet. Anschließend wurde 15 min bei 3000 Upm zentrifugiert, 1,0 ml des Überstandes zur Phosphatbestimmung entnommen. Zur Ermittlung der im Gewebe enthaltenen Phosphatkonzentration sowie spontanen Hydrolyse des zugesetzten Glucose-6-Phosphats und des Reagentienblankwertes wurden Proben inkubiert, die 0,5 ml Homogenat + 0,5 ml Maleatpuffer, 0,5 ml Glucose-6-P-Lösung + 0,5 ml Maleatpuffer oder 1,0 ml Maleatpuffer enthielten.

Die Phosphatbestimmung erfolgte nach der Methode von FISKE und SUBBAROW (1925).

Zu 1,0 ml des enteiweißten Überstandes bzw. 1,0 ml einer Phosphatstandardlösung ($5 \cdot 10^{-4}\text{M}$) wurden 5,0 ml einer Ammoniummolybdatlösung¹ ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$) pipettiert. 1 min später wurde 1,0 ml Reduktionslösung² hinzugegeben und umgeschüttelt. Nach 30 min wurde die Intensität des entstandenen blauen Farbstoffs bei $\lambda = 660\text{ m}\mu$ mit einem Spectrophotometer der Firma Beckmann gemessen.

Durch Vergleich mit dem Standard wurde unter Berücksichtigung des Gewebe-Glucose-6-Phosphats und Reagentienblankwertes sowie der verschiedenen Verdünnungsfaktoren, der Inkubationszeit und der eingesetzten Gewebemenge die

¹ 2,5 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 14,0 ml konz. H_2SO_4 , aqua dest. ad 1000

² 5,2 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ oder 5,7 g NaHSO_3 , 0,2 g Na_2SO_3 , 0,1 g 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonsäure, dest. Wasser ad 100 ml

Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Dimension μmol umgesetztes Glucose-6-P/g Feuchtgewicht $\times$ min errechnet. Da bei Bezug auf das Frischgewicht Aktivitätsänderungen bei Veränderungen des Eiweißgehaltes im Gewebe vorgetauscht werden können, wurde die Eiweißkonzentration im $10\,000 \cdot \text{g}$ Überstand des Leberhomogenates bestimmt und die Umsatzgeschwindigkeit der Glucose-6-Phosphatase auch darauf bezogen. Die Dimension war in diesem Falle $\text{n mol/mg Protein} \times \text{min}$.

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach LOWRY, ROSENBROUGH, FARR und RANDALL (1951).

Hierzu wurden je 1,0 ml des hundertfach verdünnten Überstandes bzw. einer Eichreihe mit Konzentrationen zwischen 0 und $150 \text{ } \mu\text{g}$ Rinderalbumin/ml in Reagenzgläser pipettiert. Nach Zugabe von 5,0 ml alkalischer Cu SO_4 Lösung¹ wurde 10 min gewartet und anschließend 0,5 ml Reagenz nach FOLIN und CIOCALTEU² zugegeben, das kurz zuvor mit aqua dest. 1:1 verdünnt wurde. 30 min später wurde die Absorption des entstandenen blauen Farbstoffs bei der Wellenlänge $\lambda = 750 \text{ m}\mu$ spektrophotometrisch gemessen. Die Konzentration wurde in $\text{mg Protein/ml Homogenat}$ angegeben.

2.6.2.

Histologie der Bauchspeicheldrüse

Zur histologischen Untersuchung wurden die Bauchspeicheldrüsen unmittelbar nach Tötung der Tiere entnommen und in Bouin'scher Flüssigkeit 24 Stunden fixiert. Nach Einbettung in Paraffin wurden 5μ dicke Schnitte hergestellt, die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden. Außerdem wurde zur Darstellung des in den B-Zellen granulär gebundenen Insulins Spezialfärbungen mit Chromalaun-Gallocyanin nach BOCK und ULLMANN (1967) sowie Aldehydfuchsin nach SCOTT (1952) bzw. GOMORI (1950) vorgenommen.

Für fotografische Aufnahmen der histologischen Schnitte wurde eine 400fache Vergrößerung gewählt. Als Filmmaterial diente für schwarz-weiß Bilder Kodak Panatomo-X (FX 135-20, 16 DIN, 32 ASA), farbige Bilder wurden auf Kodachrome II für Kunstlicht (KA-135-20 P, 17 DIN, 40 ASA) aufgenommen.

¹ Frisch zubereitet aus:

50 Vol. 2%ige Na_2CO_3 in $\text{n}/10 \text{ NaOH}$
0,5 Vol. 1%ige $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ Lösung
0,5 Vol. 2%ige K-Tartrat-Lösung

² Phenolreagenz (1 l = 1,22 kg)

2.7. STATISTIK

Zur statistischen Auswertung wurden die arithmetischen Mittelwerte ($\bar{x}$) sowie die Standardabweichungen der Einzelwerte (s) und der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) nach folgenden Formeln berechnet.

$$1. \bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

$$2. S = \sqrt{\frac{\sum x^2 - \bar{x} \sum x}{n - 1}}$$

$$3. S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Auf den Tabellen und Abbildungen sind die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen angegeben. Zum Nachweis signifikanter Unterschiede wurde nicht der üblicherweise verwendete T-Test benutzt, da in einigen Fällen die Streuung der zu vergleichenden Gruppen stark differierte und unter diesen Umständen eine Berechnung nach diesem Verfahren nicht erfolgen darf. Um zu vergleichbaren Resultaten zu gelangen, wurden daher bei allen Versuchen die Signifikanzen nach dem U-Test berechnet (WEBER, 1967). Dieses Verfahren erlaubt den Vergleich von Gruppen mit unterschiedlicher Verteilung.

3. ERGEBNISSE

3.1. VERSUCHE AN MÄUSEN

3.1.1. Einfluß von Streptozotocin auf die Blutzuckerkonzentration

24 Stunden nach intravenöser Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin war die Glucosekonzentration im Blut bei gefütterten Tieren gegenüber unbehandelten Kontrollen nur geringfügig und nicht signifikant erhöht. Auch nach 3 Tagen führte diese Dosis nicht zu einer deutlichen Steigerung der Blutzuckerkonzentration. Wurden dagegen 200 mg/kg injiziert, so bestand bereits nach 24 Stunden eine hochgradige Hyperglykämie. Eine weitere Erhöhung der Dosis auf 300 mg/kg hatte keine zusätzliche Steigerung des diabetogenen Effektes von Streptozotocin zur Folge (Tabelle 4). Eine längere Beobachtung war nicht möglich, da die Tiere unter den Zeichen eines diabetischen Komas starben.

Glucosekonzentration im Blut gefütterter Mäuse nach i.v. Injektion verschiedener Dosen von Streptozotocin. ($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test; — = $p > 0,05$; + = $p < 0,05$; ++ = $p < 0,02$).

Dosis: mg/kg (Zeit)	n	mg%	Signifikanz gegen Kontrollen
Kontrollen	5	114,3 $\pm$ 6,4	
75 (24 Std.)	5	132,6 $\pm$ 6,4	—
75 (72 Std.)	5	147,2 $\pm$ 1,5	++
200 (24 Std.)	4	338,4 $\pm$ 71,7	++
300 (24 Std.)	7	272,7 $\pm$ 33,0	++
300 (48 Std.)	7	421,7 $\pm$ 20,9	++

Tabelle 4

3.1.2. Insulininkretion

An 16 Stunden nüchternen Mäusen wurde 2 Tage nach intravenöser Injektion von 300 mg/kg Streptozotocin die Beeinflussung der glucoseabhängigen Insulininkretion studiert. Auch bei nüchternen Tieren war unter dem Einfluß dieser Dosis die Glucosekonzentration im Blut gegenüber den Kontrollen sehr stark erhöht. Die gleiche Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Tieren zeigte sich auch 30 min nach oraler Gabe von 2 g/kg Glucose. Zum gleichen Zeitpunkt war die Insulinkonzentration im Serum bei den Kontrollen dreimal so hoch wie bei den behandelten Mäusen (Tabelle 5).

Einfluß von Streptozotocin (300 mg/kg, i.v., 2 Tage) auf die Glucosekonzentration im Blut und die durch Glucose stimulierbare Insulininkretion 16 Std. nüchterner Mäuse.

$[\bar{x} \pm s_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$; $() = n$

Gruppe	[nüchtern] Blutglucose (mg%)	[30 min nach 2 g/kg Glucose p.o.] Blutglucose (mg%)	Seruminsulin (μ E/ml)
Kontrollen	79,8 $\pm$ 2,5 (18)	145,8 $\pm$ 6,7 (19)	9,8 $\pm$ 2,6 (18)
Streptozotocin	346,6 $\pm$ 19,2 (19)	435,6 $\pm$ 18,0 (20)	3,2 $\pm$ 0,6 (20)
Signifikanz gegen Kontrollen	+ +	+ +	+

Tabelle 5

3.1.3. Schlußfolgerung

Diese Befunde zeigen, daß Streptozotocin in Dosen von 200-300 mg/kg bei Mäusen innerhalb von 24 Stunden zu einer Hyperglykämie führt, die mit einem Insulinmangel einhergeht.

3.2. VERSUCHE AN RATTEN

An dieser Tierart wurden zwei Fragestellungen untersucht. In einer ersten Versuchsserie wurden Experimente mit Dosen durchgeführt, die nach Literaturangaben sicher diabetogen wirken. Durch biochemische und histologische Untersuchungen sollten hierbei zunächst die grundsätzlichen Veränderungen studiert werden, die unter dem Einfluß des Antibiotikums auftreten.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde anschließend der zeitliche Ablauf bis zur Entstehung eines manifesten Diabetes verfolgt und geprüft, ob entsprechend den Angaben einiger Autoren eine sichere Beziehung zwischen der injizierten Streptozotocindosis und dem Schweregrad des Insulinmangels mit seinen Auswirkungen auf den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel besteht.

3.2.1. Experimente zur Charakterisierung des Streptozotocin-Diabetes

3.2.1.1. Glucosekonzentration im Blut

24 Stunden nach intravenöser Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin, einer Dosis, die nach den Angaben von JUNOD, LAMBERT, STAUFFACHER und RENOLD (1969) zu einem schweren Diabetes mellitus führt, war die Glucosekonzentration im Blut gefütterter Ratten auf über 300 mg% erhöht. Nach weiteren 2 Tagen war die Blutglucose sogar auf Werte über 500mg% angestiegen. Eine Erhöhung der Dosis auf 150 mg/kg der Substanz hatte keine weitere Steigerung der diabetogenen Wirkung zur Folge (Tabelle 6).

Glucosekonzentration im Blut gefütterter Ratten nach i.v. Injektion
verschiedener Dosen von Streptozotocin.

($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$)

Gruppe	n	mg%	
		nach 24 Std.	nach 72 Std.
Kontrollen	5	89,7 $\pm$ 0,2	123,3 $\pm$ 5,6
75 mg/kg	5	329,9 $\pm$ 11,7	514,8 $\pm$ 57,4
Signifikanz gegen Kontrollen		+ +	+ +
Kontrollen	10	100,4 $\pm$ 4,3	—
150 mg/kg	10	279,3 $\pm$ 7,6	—
Signifikanz gegen Kontrollen		+ +	

Tabelle 6

Alle weiteren Experimente in dieser Versuchsreihe wurden deshalb mit Dosen zwischen 75 und 150 mg/kg Streptozotocin durchgeführt.

3.2.1.2.

Insulininkretion

Wie die in der Abbildung 1 dargestellten Befunde zeigen, geht die Blutzuckersteigerung nach Gabe von Streptozotocin mit einer Erniedrigung der Insulinkonzentration im Serum einher. 24 Stunden nach intravenöser Injektion von 150 mg/kg hatte die Insulinkonzentration im Serum gegenüber den Kontrollen um mehr als die Hälfte abgenommen. Wurde die Blutzuckerkonzentration durch i.v. Injektion von Glucose erhöht, also ein Reiz ausgeübt, der bei funktionstüchtigen B-Zellen mit einer erheblichen Steigerung der Insulininkretion beantwortet wird, kam es nach Gabe von Streptozotocin nicht zu einem Anstieg des Seruminsulins.

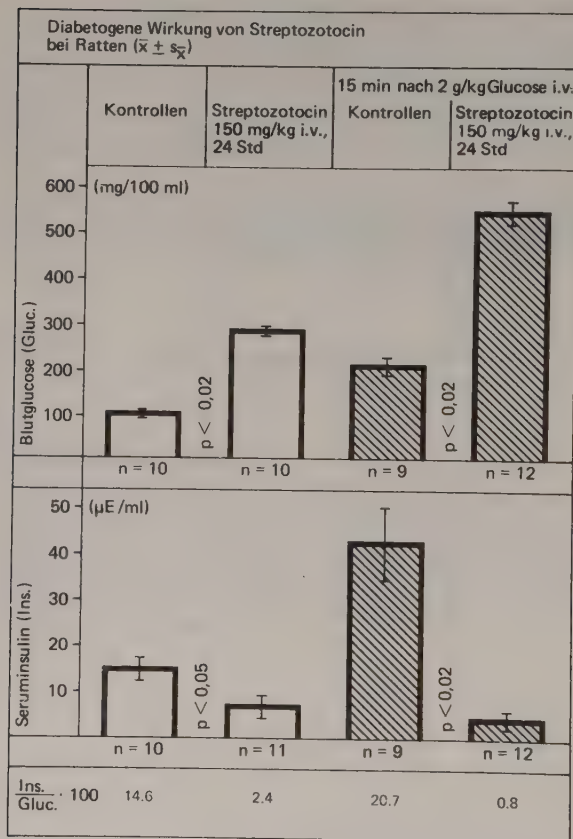


Abbildung 1

Ebenso wie auf Glucose reagierten die behandelten Ratten auch nicht mit einer Insulinfreisetzung, wenn ihnen ein betazytotropes Sulfonamid appliziert wurde. Während bei normalen Ratten 60 min nach i.v. Injektion von 250 mg/kg Glymidin Na (Glykodiazin) die Insulinkonzentration im Serum von 46 auf 96 μ E/ml anstieg und gleichzeitig die Blutzuckerkonzentration von 52 auf 17 mg% abfiel, wurden bei streptozotocindiabetischen Tieren keine Veränderungen der erhöhten Blutzucker- und erniedrigten Seruminsulinwerte beobachtet (Tabelle 7).

Einfluß von Streptozotocin (100 mg/kg, i.v., 2 Tage) auf die blutzuckersenkende und insulinfreisetzende Wirkung von Glymidin Na (250 mg/kg, i.v., 60 min).

$[\bar{x} \pm S_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$; $() = n$

Gruppe	Blutzucker (mg%)				
		physiologische NaCl-Lösung		Glymidin Na	
Kontrollen	(15)	51,6 $\pm$ 1,6	$\leftarrow + + \rightarrow$	16,8 $\pm$ 2,7	(15)
		$\uparrow$ + +		$\uparrow$ + +	
Streptozotocin	(10)	208,3 $\pm$ 23,6	$\leftarrow - \rightarrow$	238,2 $\pm$ 16,9	(8)
		$\downarrow$		$\downarrow$	
Gruppe	Seruminsulin (μ E/ml)				
		physiologische NaCl-Lösung		Glymidin Na	
Kontrollen	(15)	46,4 $\pm$ 4,2	$\leftarrow + + \rightarrow$	96,0 $\pm$ 10,2	(15)
		$\uparrow$ + +		$\uparrow$ + +	
Streptozotocin	(10)	15,8 $\pm$ 3,2	$\leftarrow - \rightarrow$	19,9 $\pm$ 4,1	(8)
		$\downarrow$		$\downarrow$	

Tabelle 7

3.2.1.3.

Konzentration der freien Fettsäuren im Serum

24 Stunden nach intravenöser Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin betrug die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum $1,2 \pm 0,2$ mval/l und lag damit zehnfach höher als in der Kontrollgruppe. Dort wurden $0,12 \pm 0,03$ mval/l gemessen (Abbildung 2, oberer Teil).

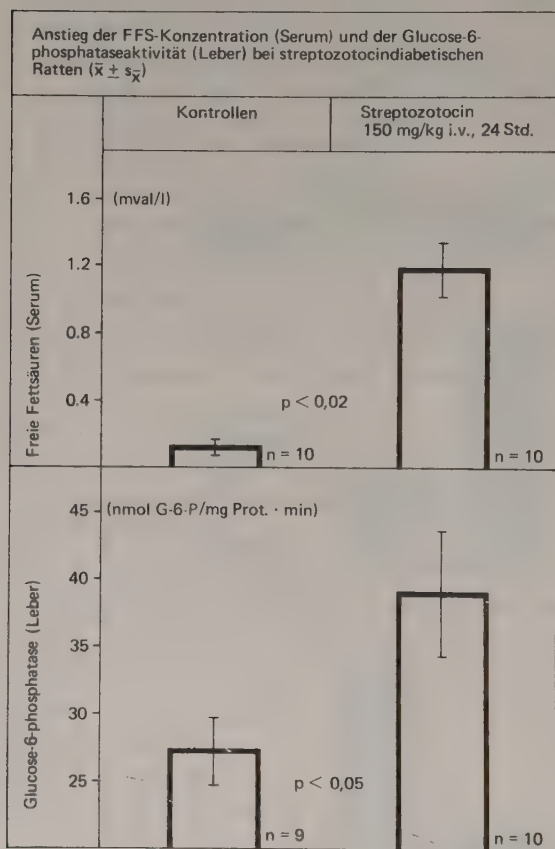


Abbildung 2

3.2.1.4.

Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber

In gleicher Weise wie die Blutzuckerkonzentration und der Fettsäuregehalt im Serum nahm auch die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Leber streptozotocindiabetischer Ratten zu. Die Veränderungen waren sowohl in bezug auf das Feuchtgewicht des Gewebes als auch auf den Proteingehalt des untersuchten Homogenats signifikant (Abbildung 2, unterer Teil, Tabelle 8).

Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber von Ratten 24 Stunden nach i.v. Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin.

($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test)

Dimension	Kontrollen n = 9		Streptozotocin n = 10
$\frac{\mu\text{mol G-6-P}}{\text{g FG} \cdot \text{min}}$	$3,50 \pm 0,27$	$p < 0,02$	$5,57 \pm 0,52$
$\frac{\text{nmol G-6-P}}{\text{mg Prot.} \cdot \text{min}}$	$27,3 \pm 2,6$	$p < 0,05$	$39,1 \pm 4,5$

Tabelle 8

3.2.1.5.

Intravenöse Glucosetoleranz und Glucoseoxydation

Eine Aussage über den Unterschied in der Glucoseelimination aus dem Blut und der Oxydation von radioaktiv markierter Glucose zu CO_2 ist nur dann sinnvoll, wenn die Blutzuckerkonzentration und die spezifische Aktivität der markierten Glucose im Blut zu Beginn der Meßperiode keine wesentlichen Unterschiede zeigen. Das Ausmaß der Glucoseoxydation hängt einerseits ab von der angebotenen Substratmenge, d.h. der Glucosekonzentration im Blut. Andererseits sind Rückschlüsse aus der Oxydation markierter Glucose zu CO_2 nur möglich, wenn der Anteil des radioaktiven Zuckers an der im Blut vorhandenen Glucose bei allen Tieren etwa gleich ist.

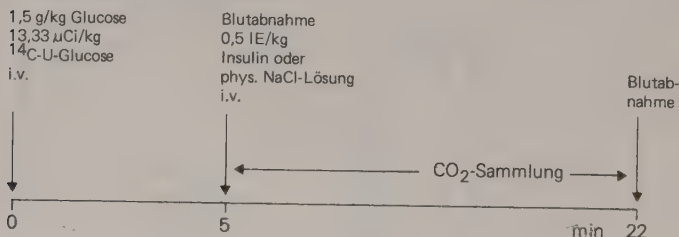
Um diese Bedingungen zu erfüllen, wurden die Versuche an Tieren durchgeführt, die nach i.v. Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin zwar im gefütterten Zustand eine erhebliche Hyperglykämie und Glukosurie aufwiesen, nach sechzehnständigem Futterentzug aber nur eine etwa doppelt so hohe Blutzuckerkonzentration hatten wie die Kontrollen. 5 min nach i.v. Injektion von 1,5 g/kg Glucose (mit 13,33 $\mu\text{Ci/kg}$ ^{14}C -U-Glucose) betrug die Glucosekonzentration im Blut bei beiden Gruppen etwa 350 mg%.

Während bei den Kontrollen im Verlauf der folgenden 17 min die Blutglucose auf 194,0 mg% abfiel, wurden bei den diabetischen Tieren zum gleichen Zeitpunkt 309,0 mg% gemessen. Die Eliminationskonstante k_G ($\frac{\ln BZ_1 - \ln BZ_2}{t_2 - t_1}$), die

die Geschwindigkeit der Glucoseelimination aus dem Blut charakterisiert, hatte von 3,5 auf 0,8 abgenommen. Zugleich war die in dieser Zeit gebildete, mit der Ausatemungsluft abgegebene radioaktive Kohlensäure von 807 auf 368 dpm/kg zurückgegangen.

Erhielten die streptozotocindiabetischen Tiere nach der ersten Blutentnahme zur Bestimmung des Blutzuckerausgangswertes 0,5 IE/kg Altinsulin i.v. injiziert, so wurde die Glucoseoxydation wieder normalisiert und die Glucoseelimination sogar über den bei den Kontrollen gemessenen Wert gesteigert. (Tabelle 9).

Versuchsanordnung zu Tabelle 9:



Verminderung der Glucoseelimination aus dem Blut und der Oxydation von ^{14}C -U-Glucose bei streptozotocindiabetischen¹ Ratten und ihre Normalisierung durch Insulin.

($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$; 175 mg/kg, 9 Tage)

Gruppe	Blutglucose mg%		k_G	$^{14}\text{CO}_2$ -Bildung 5.-22. min (dpm/kg)
	nach 5 min	nach 22 min		
Kontrollen (n = 10)	350,3 $\pm$ 6,8	194,3 $\pm$ 10,4	2,12 $\pm$ 0,16	807,3 $\pm$ 37,7
Signifikanz	$\uparrow$ — $\downarrow$	$\uparrow$ ++ $\downarrow$	$\uparrow$ ++ $\downarrow$	$\uparrow$ ++ $\downarrow$
Streptozotocin (n = 7)	352,7 $\pm$ 12,3	308,8 $\pm$ 11,9	0,47 $\pm$ 0,07	367,5 $\pm$ 18,6
Signifikanz	$\uparrow$ — $\downarrow$	$\uparrow$ ++ $\downarrow$	$\uparrow$ ++ $\downarrow$	$\uparrow$ ++ $\downarrow$
Streptozotocin + Insulin (n = 5)	353,7 $\pm$ 10,5	78,5 $\pm$ 12,9	5,51 $\pm$ 0,56	815,1 $\pm$ 181,9

Tabelle 9

3.2.1.6.

Histologie der Bauchspeicheldrüse

Histologische Untersuchungen wurden bei gefütterten Tieren einen Tag nach Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin durchgeführt. Bei den Kontrollen bestand in den Langerhansschen Inseln eine Relation der A zu den B-Zellen wie etwa 1:4. Die Zellen waren in Form vollständiger oder unvollständiger Randschalen um die in der Mitte liegenden B-Zellen angeordnet. Die B-Zellen wiesen eine mittelstarke Granulierung auf, die nach der angewendeten Färbemethode (SCOTT) dunkel-rotviolett imponierte (Abbildung 3).

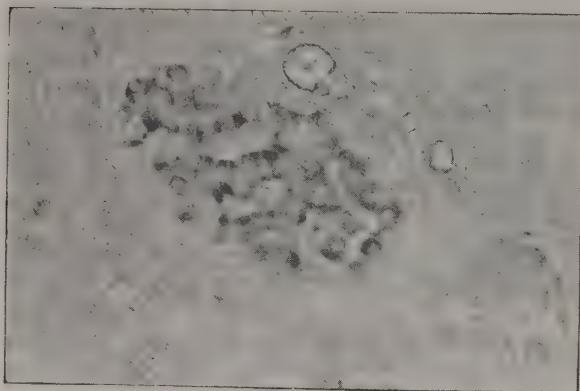


Abbildung 3

Langerhanssche Insel einer normalen Ratte mit granulierten B-Zellen (schwarz) und einer Randschale von A-Zellen. Färbung: SCOTT.

Bei den mit Streptozotocin behandelten Tieren war es zu einer völligen Degranulierung der B-Zellen gekommen, deren Größe stark reduziert erschien. Ein Teil dieser Zellen wies degenerative Veränderungen in Form von Pyknose, Karyolyse und verdichtetem Cytoplasma mit perinukleären Höfen auf. Zwischen den B-Zellen waren in einigen Fällen auch optisch deutlich leere interzelluläre Räume erkennbar. Die A-Zellen waren nicht verändert, ihre Relation zu den B-Zellen hatte sich zu ihren Gunsten verschoben. Das A:B Verhältnis betrug in den meisten Fällen 1:1 oder sogar 2:1. Die Ursache hierfür dürfte auf der Verkleinerung des Inselkerns als Folge der B-Zelldegeneration beruhen (Abbildung 4). Eine Schädigung des exokrinen Pankreas ließ sich nicht nachweisen.

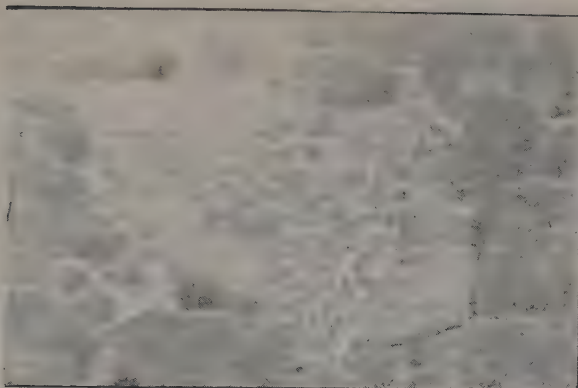


Abbildung 4

Langerhanssche Insel einer streptozotocindiabetischen Ratte (150 mg/kg). Im Zentrum degranulierte, pyknotische B-Zellen, in der Peripherie relative Zunahme von A-Zellen. Färbung: SCOTT.

3.2.1.7.

Schlußfolgerung

Streptozotocin führt bei Ratten zu einer selektiven Zerstörung der B-Zellen in den Langerhansschen Inseln. Der hieraus resultierende Insulinmangel geht mit einer Hyperglykämie, Steigerung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber, Hemmung der Glucoseutilisation und -oxydation zu CO_2 und einem Anstieg der Konzentration freier Fettsäuren im Serum einher.

3.2.2.

Zeitlicher Ablauf und Dosisabhängigkeit der Streptozotocinwirkung

3.2.2.1. Blutzuckerkonzentration

3.2.2.1.1.

Veränderungen innerhalb der ersten 5 Stunden

Die bisher besprochenen Resultate haben ergeben, daß bereits 24 Stunden nach intravenöser Injektion von Streptozotocin das Vollbild eines Diabetes mellitus mit entsprechenden morphologischen und biochemischen Abweichungen besteht. Es erschien daher interessant, die Wirkung verschiedener Streptozotocindosen in den ersten Stunden nach i.v. Injektion zu verfolgen. Aus diesem Grunde wurde vor sowie nach Gabe der Substanz in stündlichen Abständen die Glucosekonzentration im Blut bestimmt.

In Abhängigkeit von der gewählten Dosis (20-80 mg/kg) kam es innerhalb von 3 Stunden zu einem Anstieg der Blutzuckerkonzentration. Danach fiel die Blutglucose wieder ab und erreichte nach 5 Stunden bei den mit 20, 40 und 60 mg/kg behandelten Tieren das ursprüngliche Niveau. Unter dem Einfluß der höchsten Dosis kam es zu diesem Zeitpunkt zu einem extremen Abfall auf Werte um 10 mg% (Tabelle 10, Abbildung 5). Da die Gefahr bestand, daß die Tiere in einem hypoglykämischen Schock sterben, wurde ihnen Glucoselösung und anschließend Futter gegeben.

Dosisabhängige Veränderungen der Glucosekonzentration im Blut 16 Stunden nüchterner Ratten nach i.v. Injektion von Streptozotocin.

$[\bar{x} \pm S_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$; $() = n$

Gruppe	n	Blutglucose (mg%)					
		vor Behandlung	nach 1 Std.	nach 2 Std.	nach 3 Std.	nach 4 Std.	nach 5 Std.
Kontrollen	6	52,6 $\pm$ 3,5	36,9 $\pm$ 1,8	31,9 $\pm$ 2,1	33,3 $\pm$ 2,8	37,1 $\pm$ 1,4	36,9 $\pm$ 2,5
20 mg/kg	6	46,4 $\pm$ 1,3	44,8 $\pm$ 3,9	41,1 $\pm$ 0,87	55,8 $\pm$ 2,05	57,2 $\pm$ 2,8	57,4 $\pm$ 5,6 (5)
Signifikanz gegen Kontrollen		—	—	++	++	++	++
40 mg/kg	6	41,1 $\pm$ 1,9	45,4 $\pm$ 3,4	75,3 $\pm$ 4,0	75,3 $\pm$ 3,6	66,0 $\pm$ 4,1	49,8 $\pm$ 3,5
Signifikanz gegen Kontrollen		+	—	++	++	++	+
60 mg/kg	6	40,3 $\pm$ 3,1	51,2 $\pm$ 2,7	77,1 $\pm$ 7,7	98,2 $\pm$ 8,4	85,5 $\pm$ 8,3	55,0 $\pm$ 8,0
Signifikanz gegen Kontrollen		+	++	++	++	++	—
80 mg/kg	6	38,3 $\pm$ 3,2	57,4 $\pm$ 4,3	84,9 $\pm$ 7,0	102,4 $\pm$ 8,9	71,9 $\pm$ 9,9	10,4 $\pm$ 4,0
Signifikanz gegen Kontrollen		—	++	++	++	++	++

Tabelle 10

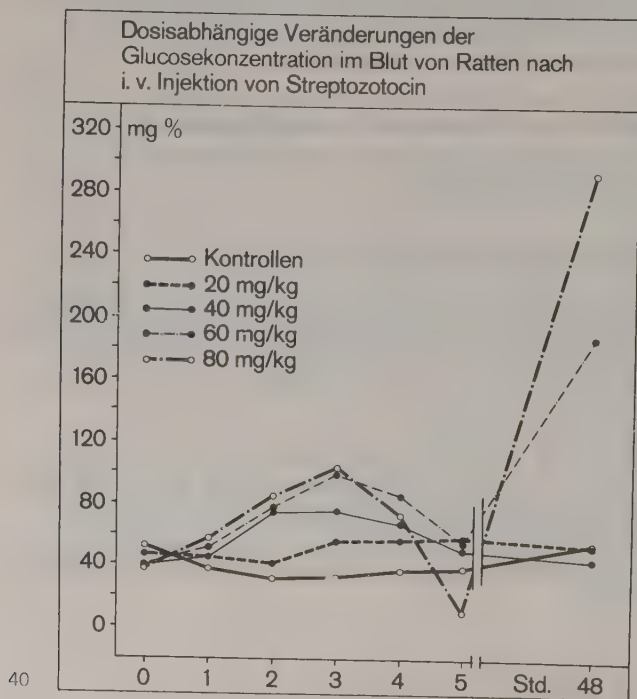


Abbildung 5

3.2.2.1.2.

Veränderungen nach 48 Stunden

2 Tage nach intravenöser Injektion von Streptozotocin war die Glucosekonzentration im Blut sowohl im nüchternen Zustand als auch nach intravenöser Gabe von Glucose dosisabhängig gesteigert (Abbildung 5 und 6, Tabelle 11). Während sich der Nüchternblutzucker bei den Kontrollen sowie den mit 20 und 40 mg/kg behandelten Tieren nicht unterschied, hatten 60 und 80 mg/kg Streptozotocin zu einem Anstieg auf 187 bzw. 291 mg% geführt. Die beiden niedrigen Dosen waren jedoch nicht ohne Wirkung geblieben. Nach einer Belastung mit 1,5 g/kg Glucose (i.v.) war nach 10 und in stärkerem Maße nach 30 min auch bei den mit 20 und 40 mg/kg behandelten Ratten die Glucosekonzentration im Blut höher als bei den Kontrollen. Offenbar hatten diese Dosen nur zu einer geringeren Schädigung des endokrinen Teils der Bauchspeicheldrüse und damit der Insulininkretion geführt, die sich zwar bei nüchternen Tieren nicht in einer Steigerung der Blutglucose auswirkt, nach Belastung mit Glucose oder Futteraufnahme jedoch zu einer manifesten Stoffwechselstörung führt. Hierfür sprach ebenfalls, daß schon 40 mg/kg Streptozotocin eine Glukosurie zur Folge hatte (Glukotest, Boehringer).

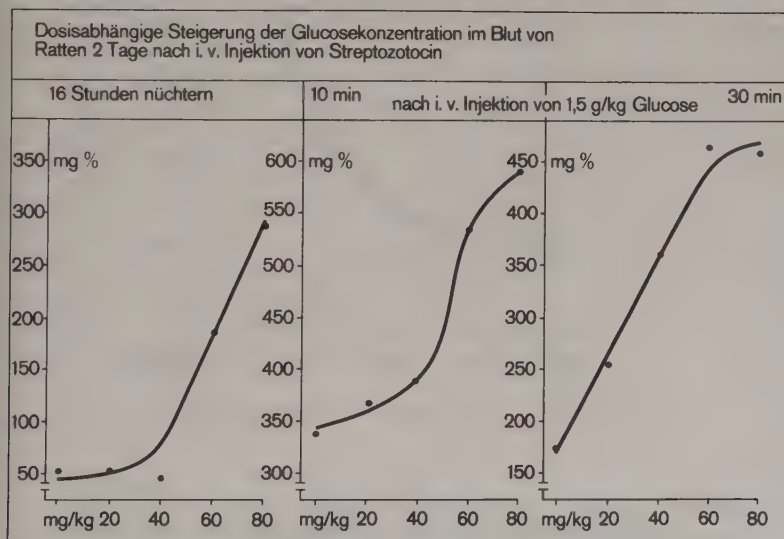


Abbildung 6

Dosisabhängige Steigerung der Glucosekonzentration im Blut 16 Stunden
nüchterner Ratten 2 Tage nach i.v. Injektion von Streptozotocin.

[$\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test (einseitig); $- = p > 0,05$; $+ = < 0,05$;
 $++ = p < 0,02$; () = n]

Gruppe	Vorwert	Blutglucose (mg%)		Seruminsulin $\mu\text{E/ml}$
		10 min nach 1,5 g/kg Glucose	30 min	10 min n. 1,5 g/kg Glucose
Kontrollen (6)	53,5 $\pm$ 3,6	338,0 $\pm$ 4,9	174,8 $\pm$ 15,7	99,5 $\pm$ 10,3
20 mg/kg (5)	52,6 $\pm$ 3,3	367,0 $\pm$ 8,5	253,4 $\pm$ 11,7	56,4 $\pm$ 2,3
Signifikanz >Ko.	—	+	++	++
40 mg/kg (6)	45,0 $\pm$ 2,3	388,3 $\pm$ 5,1	360,2 $\pm$ 9,7	28,4 $\pm$ 2,2
Signifikanz >Ko.	—	++	++	++
60 mg/kg (6)	186,7 $\pm$ 32,3	534,9 $\pm$ 31,5	463,9 $\pm$ 23,3	23,0 $\pm$ 2,5
Signifikanz >Ko.	+	++	++	++
80 mg/kg (6)	290,6 $\pm$ 6,1	589,7 $\pm$ 7,7	458,8 $\pm$ 7,3	22,2 $\pm$ 2,1
Signifikanz >Ko.	++	++	++	++

Tabelle 11

3.2.2.2.

Insulininkretion

Eine Bestätigung dieser Annahme ergab die Untersuchung der durch Glucose stimulierbaren Insulininkretion (Tabelle 11, Abbildung 7).

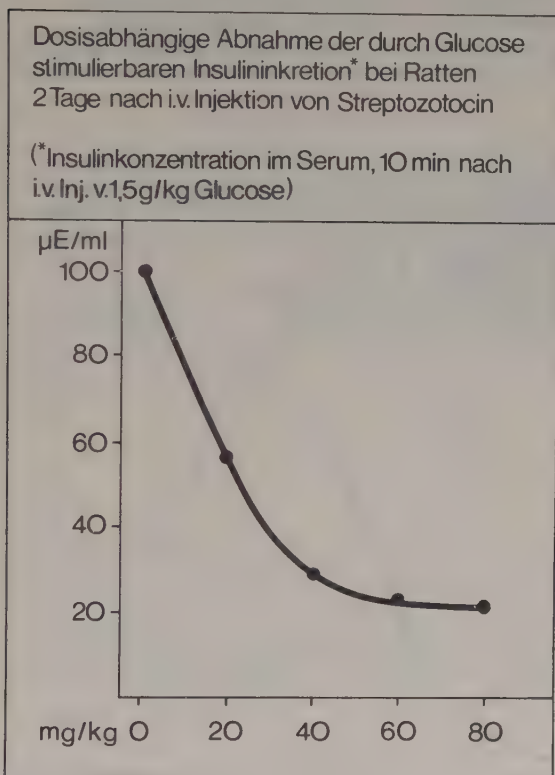


Abbildung 7

10 min nach intravenöser Injektion von 1,5 g/kg Glucose war die Insulinkonzentration im Serum der Kontrollen auf 100 μ E/ml angestiegen. Bereits bei Tieren, die nur 20 mg/kg erhalten hatten, wurde eine nur etwa halb so hohe Konzentration des Hormons gemessen, nach Gabe von 40 mg/kg lag die Insulinkonzentration unter 30 μ E/ml und unterschied sich nicht mehr signifikant von den Werten, die unter dem Einfluß einer Dosis von 80 mg/kg gemessen wurden.

3.2.2.3.

Freie Fettsäuren im Serum

Die gleiche Abhängigkeit zwischen Streptozotocindosis und Schweregrad des Diabetes zeigt sich auch in der Störung des Fettstoffwechsels. Um eine durch Fasten bedingte Steigerung der Lipolyse zu vermeiden, wurden die Untersuchungen an gefütterten Tieren vorgenommen. Während 20 mg/kg Streptozotocin noch keine Steigerung der Fettsäurenkonzentration im Serum gegenüber den Kontrollen bewirkten, war bei den mit 40, 60 und 80 mg/kg behandelten Ratten der Gehalt an freien Fettsäuren auf 0,44, 0,66 bzw. 0,78 mval/l erhöht (Abbildung 8, Tabelle 12).

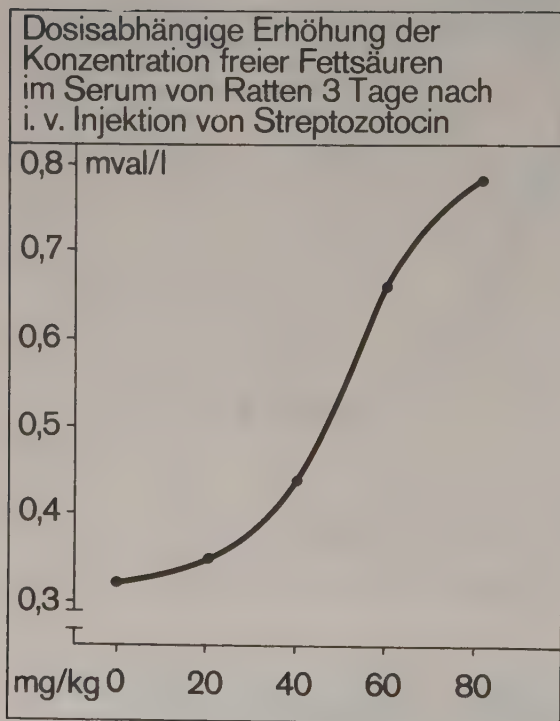


Abbildung 8

3.2.2.4.

Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber

Ein gleiches Resultat zeigte sich bei der Bestimmung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber, unabhängig davon, ob die Umsatzgeschwindigkeit auf das Feuchtgewicht oder den Proteingehalt bezogen wurde. 20 mg/kg Streptozotocin hatten noch keinen Effekt, 40, 60 und 80 mg/kg führten zu einem Anstieg auf das doppelte bzw. drei- bis vierfache des Kontrollwertes (Tabelle 12, Abbildung 9).

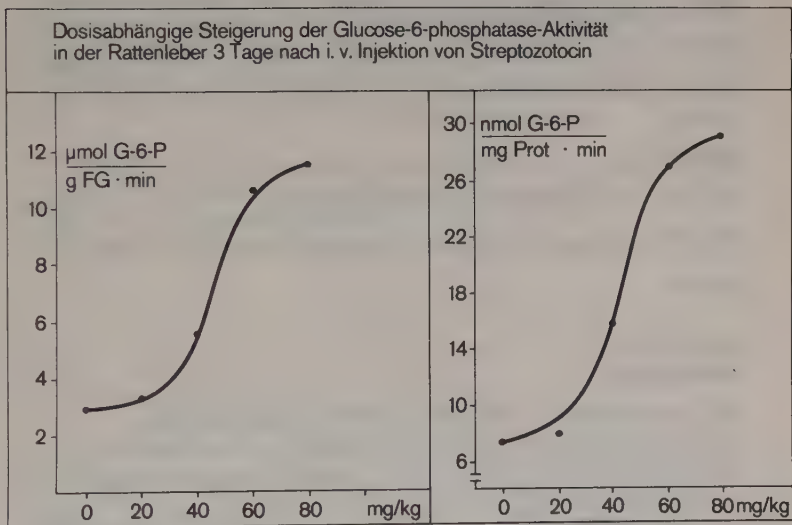


Abbildung 9

Dosisabhängige Steigerung der Konzentration freier Fettsäuren im Serum und der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber gefütterter Ratten 3 Tage nach i.v. Injektion von Streptozotocin.

$[\bar{x} \pm S_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$

Gruppe	n	Freie Fettsäuren mval/l Serum	Glucose-6-Phosphatase	
			$\mu\text{mol/g FG} \cdot \text{min}$	$\text{nmol/mg Prot.} \cdot \text{min}$
Kontrollen	6	$0,32 \pm 0,05$	$3,0 \pm 0,23$	$7,7 \pm 0,62$
20 mg/kg	5	$0,35 \pm 0,07$	$3,3 \pm 0,28$	$8,1 \pm 0,60$
Signifikanz: >Ko.		—	—	—
40 mg/kg	6	$0,44 \pm 0,05$	$5,6 \pm 0,50$	$15,8 \pm 1,8$
Signifikanz: >Ko.		+	++	++
60 mg/kg	6	$0,66 \pm 0,08$	$10,6 \pm 0,32$	$27,1 \pm 2,3$
Signifikanz: >Ko.		++	++	++
80 mg/kg	6	$0,78 \pm 0,07$	$11,6 \pm 1,1$	$29,1 \pm 2,0$
Signifikanz: >Ko.		++	++	++

Tabelle 12

3.2.2.5.

Schlußfolgerung

Streptozotocin besitzt in einem Bereich zwischen 20 und 80 mg/kg eine dosisabhängige Wirkung. Zur Erzeugung eines latenten Diabetes mellitus ohne Nüchternhyperglykämie, aber sicherer Verschlechterung der Glukosetoleranz, der Glucose stimulierbaren Insulininkretion und leichter Störung des Fettstoffwechsels, eignet sich eine Dosis von 40 mg/kg, höhere Dosen führen zu einem manifesten Diabetes mellitus.

3.3.

EXPERIMENTE AN CHINESISCHEN STREIFENHAMSTERN

3.3.1.

Blutzuckerkonzentration

Entsprechend einer bei Ratten sicher wirksamen Dosis wurde zunächst die diabetogene Wirkung von 75 mg/kg Streptozotocin bei chinesischen Streifenhamstern untersucht. Wie die Tabelle 13 zeigt, war nach 24 Stunden die Glucosekonzentration im Blut gefütterter Tiere auf Werte um 300 mg% erhöht. Nach 2 Tagen wurden keine wesentlichen Veränderungen beobachtet, nach 3 Tagen waren 60 % der Tiere unter den Zeichen einer Acidose gestorben, die noch lebenden befanden sich in einem präfinalen Zustand.

Glucosekonzentration im Blut gefütterter chinesischer Streifenhamster nach i.v. Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin.

$[\bar{x} \pm S_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$; () = n

Gruppe	Blutglucose (mg%)		
	nach 1 Tag	nach 2 Tagen	nach 3 Tagen
Kontrollen	124,5 $\pm$ 5,0 (10)	118,4 $\pm$ 4,1 (10)	—
75 mg/kg	299,9 $\pm$ 20,6 (8)	263,3 $\pm$ 29,7 (7)	—
Signifikanz gegen Kontrollen	++	++	
Kontrollen	115,7 $\pm$ 5,7 (17)	—	120,9 $\pm$ 16,1 (5)
75 mg/kg	327,8 $\pm$ 57,4 (5)	—	[70,1 $\pm$ 3,0 (2) 3 $\pm$ 1 —
Signifikanz gegen Kontrollen	++		

Tabelle 13

Versuche mit 300 mg/kg Streptozotocin lassen keine eindeutige Aussage darüber zu, ob eine Erhöhung der Dosis zu einer Verstärkung des Effektes führt. Zwar lag bereits 24 Stunden nach i.v. Injektion dieser Dosis die Blutzuckerkonzentration im nüchternen Zustand und nach oraler Glucosebelastung höher als 48 Stunden nach Gabe von 75 mg/kg (Tabelle 14, Abbildung 10, oberer Teil).

Glucosekonzentration im Blut nüchterner chinesischer Streifenhamster nach i.v. Injektion von 75 oder 300 mg/kg Streptozotocin.

$[\bar{x} \pm S_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p \leq 0,05$; $++ = p < 0,02$; $() = n$

Gruppe	Blutglucose (mg%)	
	nüchtern	30 min. n. 2 g/kg Glucose p.o.
Kontrollen	118,0 $\pm$ 3,5 (20)	199,7 $\pm$ 11,3 (20)
75 mg/kg (2 Tage)	209,2 $\pm$ 39,5 (22)	230,4 $\pm$ 28,1 (22)
Signifikanz gegen Kontrollen	+	-
Kontrollen	114,1 $\pm$ 3,8 (17)	205,7 $\pm$ 12,8 (16)
300 mg/kg (1 Tag)	256,4 $\pm$ 36,7 (14)	308,0 $\pm$ 24,5 (13)
Signifikanz gegen Kontrollen	+ +	+ +

Tabelle 14

Auch die Bestimmung der Konzentration freier Fettsäuren im Serum und der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber ergab gleichartige Unterschiede zwischen den Dosen (s. 3.3.3. und 3.3.4.). Die Messung der Insulinkonzentration im Serum und die histologische Untersuchung der Langerhansschen Inseln (s. 3.3.2. und 3.3.5.) lassen es jedoch als unwahrscheinlich erscheinen, daß das Ausmaß der beta-zytotoxischen Wirkung von 75 mg/kg noch übertroffen werden kann. Im einzelnen wurden die folgenden Befunde erhoben.

3.3.2.
Insulininkretion

Nach 16stündigem Futterentzug wurden keine signifikanten Unterschiede in der Insulinkonzentration im Serum zwischen normalen und streptozotocindiabetischen Hamstern beobachtet, die 24 Stunden vorher 300 mg/kg oder 48 Stunden vorher 75 mg/kg der Substanz erhalten hatten (Abbildung 10, unterer Teil).

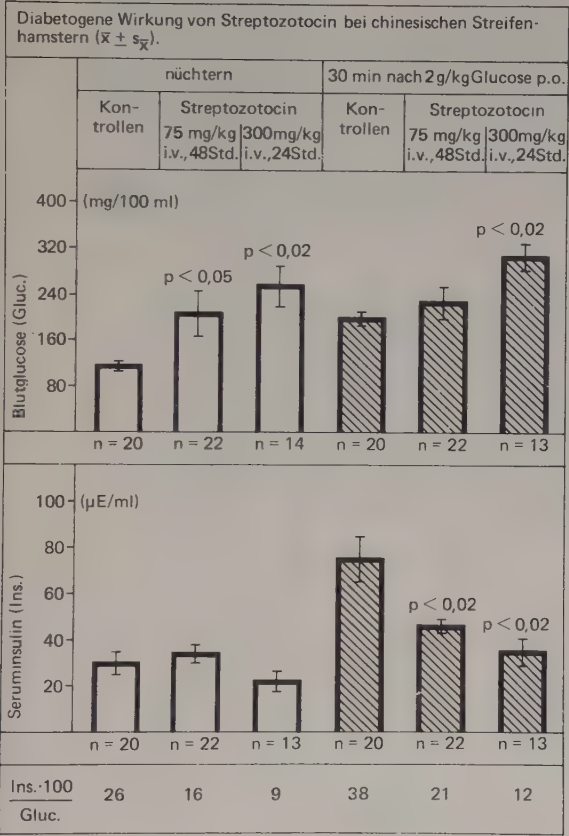


Abbildung 10

Diese Beobachtung würde zunächst gegen eine Beeinträchtigung der Inselzellfunktion durch das Antibiotikum sprechen. Man muß hierbei aber berücksichtigen, daß bei nüchternen, gesunden Tieren der Insulingehalt im Serum bereits so niedrig ist, daß eine weitere Senkung mit der radioimmunologischen Bestimmung kaum erfaßt werden kann.

Im Verhältnis zur Blutzuckerkonzentration ist bei den mit Streptozotocin behandelten Tieren die Insulinkonzentration in jedem Fall zu niedrig. Dieses Mißverhältnis wird durch eine Abnahme des Quotienten zwischen Seruminsulin und Blutglucose des sogen. „insulinogenen Index“ ausgedrückt. Gesunde Tiere reagieren auf eine derartige Erhöhung der Glucosekonzentration mit einer Steigerung der Insulininkretion. Dies zeigt sich besonders deutlich dann, wenn die Tiere zusätzlich mit Glucose belastet werden oder Futter erhalten.

Während 30 min nach oraler Gabe von 2 g/kg Glucose die Insulinkonzentration im Serum bei den Kontrollen auf 75 µE/ml ansteigt, sind die diabetischen Streifenhamster zu einer derartigen Reaktion nicht mehr fähig. Infolgedessen bleibt der niedrige insulinogene Index unverändert (s. Abbildung 10). Die gleichen Unterschiede zeigen sich, wenn die Insulinkonzentration bei gefütterten Tieren bestimmt wird (Tabelle 15).

Insulinkonzentration im Serum und Blutglucose bei gefütterten chinesischen Streifenhamstern, 2 Tage nach i.v. Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin.

$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}}; \text{Statistik: U-Test; } - = p > 0,05; + = p < 0,05; ++ = p < 0,02; () = n]$

Gruppe	Glucosekonzentration im Blut (mg%)	Insulinkonzentration im Serum (µE/ml)
Kontrollen	110,8 $\pm$ 4,1 (10)	70,8 $\pm$ 12,6 (10)
75 mg/kg (2 Tage)	263,3 $\pm$ 29,7 (8)	23,7 $\pm$ 4,8 (8)
Signifikanz gegen Kontrollen	+ +	+ +

Tabelle 15

Unter diesen Bedingungen war das Seruminulin der Kontrollen auf etwa 70 $\mu\text{E/ml}$ erhöht, während bei den diabetischen Hamstern nur ein Wert von 24 $\mu\text{E/ml}$ gemessen wurde.

Die Hemmung der durch Glucose stimulierbaren Insulininkretion schien zwar nach Injektion von 300 mg/kg etwas stärker zu sein (s. Abbildung 10), die Unterschiede gegenüber der niedrigen Dosis waren aber nicht signifikant.

3.3.3.

Freie Fettsäuren im Serum

48 Stunden nach i.v. Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin war die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum nüchterner Tiere gegenüber den Kontrollen nicht erhöht (Abbildung 11, oberer Teil).

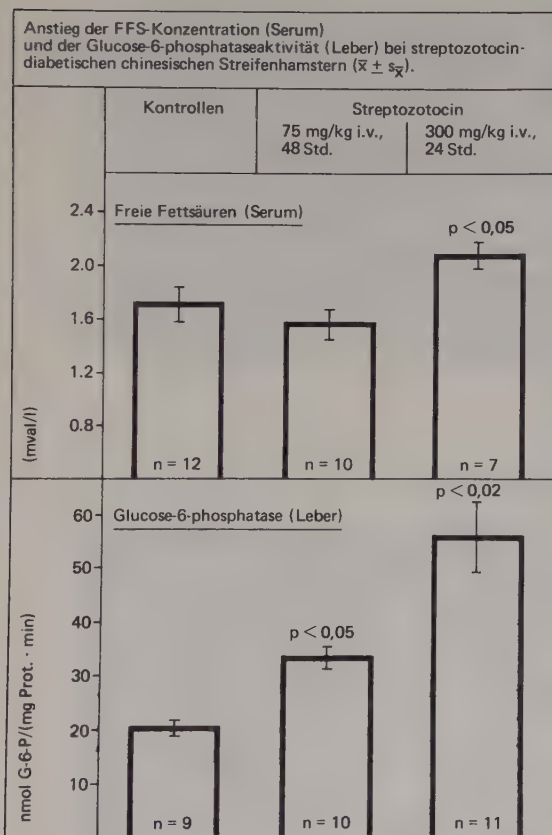


Abbildung 11

30 min nach oraler Gabe von 2 g/kg Glucose zeigte sich jedoch ein Unterschied zwischen behandelten und nicht behandelten Streifenhamstern. Während bei den normalen Tieren unter dem Einfluß des inzwischen freigesetzten Insulins die Fettsäurekonzentration abnahm, blieb sie bei den diabetischen unverändert hoch (Tabelle 16).

Konzentration freier Fettsäuren im Serum nüchterner chinesischer Streifenhamster 2 Tage nach i.v. Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin.

$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}}; \text{Statistik: U-Test (einseitig); } - = p > 0,05; + = p < 0,05; ++ = p < 0,02; () = n)$

Gruppe	nüchtern	Freie Fettsäuren (mval/l Serum)	
		Signifikanz gegen Kontrollen	30 min nach 2 g/kg Glucose p.o.
Kontrollen	(12) $1,72 \pm 0,13$	← + + →	$1,28 \pm 0,08$ (6)
75 mg/kg	(10) $1,58 \pm 0,11$	← - →	$1,76 \pm 0,41$ (5)

Tabelle 16

Dagegen war bei den mit 300 mg/kg behandelten Tieren die Fettsäurekonzentration bereits im nüchternen Zustand signifikant höher als bei normalen Streifenhamstern (s. Abbildung 11, oberer Teil).

3.3.4.

Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber

Die Umsatzgeschwindigkeit der Glucose-6-Phosphatase in der Leber war nach Gabe von 300 mg/kg und auch nach Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin gegenüber den Kontrollen erhöht (Abbildung 11, unterer Teil, Tabelle 17). Der Anstieg war sowohl in bezug auf das Feuchtgewicht als auch auf den Proteingehalt signifikant.

Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber chinesischer Streifenhamster nach i.v. Injektion von Streptozotocin.

$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}}; \text{Statistik: U-Test (einseitig); } - = p > 0,05; + = p < 0,05; ++ = p < 0,02)$

Gruppe	n	Glucose-6-Phosphatase	
		$\mu\text{mol/g FG} \cdot \text{min}$	$\text{nmol/mg Prot.} \cdot \text{min}$
Kontrollen	9	$3,61 \pm 0,13$	$20,59 \pm 1,12$
75 mg/kg (2 Tage)	10	$4,81 \pm 0,54$	$36,15 \pm 5,87$
Signifikanz	>Ko.	+	+
300 mg/kg (1 Tag)	11	$7,42 \pm 0,84$	$56,14 \pm 6,66$
Signifikanz	>Ko.	+ +	+ +
Signifikanz > 75 mg/kg		+ +	+

Tabelle 17

Auch zwischen den beiden behandelten Gruppen bestanden Unterschiede. 300 mg/kg des Antibiotikums führten innerhalb eines Tages zu einer stärkeren Aktivitätssteigerung des Enzyms als 75 mg/kg innerhalb von 2 Tagen.

3.3.5.

Histologische Untersuchung des Pankreas

Auf den Abbildungen 12 und 13 sind zwei Langerhanssche Inseln normaler chinesischer Streifenhamster dargestellt. Bei der Anfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (Abbildung 12) kann man erkennen, daß in gleicher Weise wie bei Ratten die stärker granulierten B-Zellen den Inselkern bilden, der hier allerdings von einer schmalen Randschale aus A-Zellen umgeben ist. Untersuchungen von BOQUIST (1968) haben gezeigt, daß einzelne A-Zellen sich auch zwischen den zentral gelegenen B-Zellen befinden. Die Insulinspezialfärbung nach SCOTT (Abbildung 13) zeigt die allerdings bei diesem Tier nur mittelgradig granulierten B-Zellen ebenfalls in der Mitte der Insel.

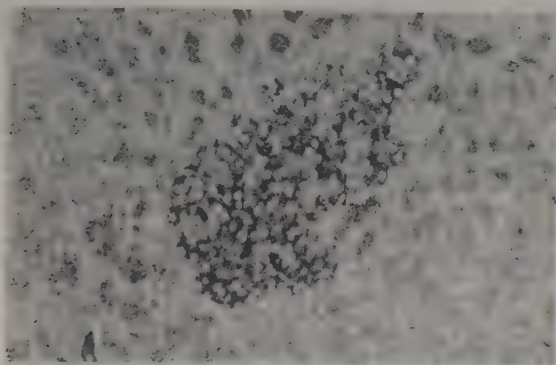


Abbildung 12
Langerhanssche Insel eines normalen chinesischen Streifenhamsters, H.E. Färbung.

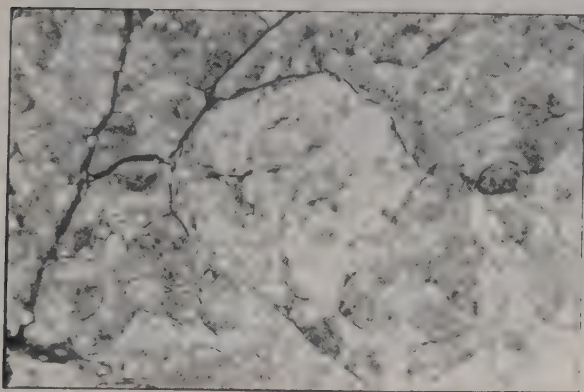


Abbildung 13
Insulinspezialfärbung (SCOTT), normale Insel mit granulierten B-Zellen.

2 Tage nach i.v. Injektion von 75 mg/kg Streptozotocin waren bei fast allen chinesischen Streifenhamstern Inselzelldegenerationen unterschiedlichen Ausmaßes eingetreten. Von der Degranulation der B-Zellen über Zellschwellung und -schrumpfung, Verdichtung des Zytoplasmas, Pyknose und Karyolyse bis hin zur vakuolären und hydropischen Degeneration waren alle Stadien der Zellschädigung nachweisbar (Abbildung 14 und 15).

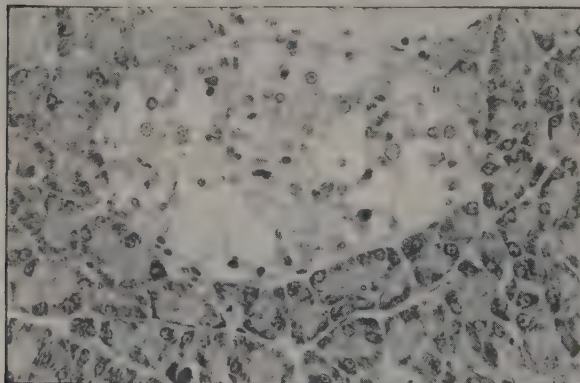


Abbildung 14

Langerhansche Insel eines Streifenhamsters nach Streptozotocininjektion (75 mg/kg, 2 Tage)
Degeneration der B-Zellen. H.E. Färbung.

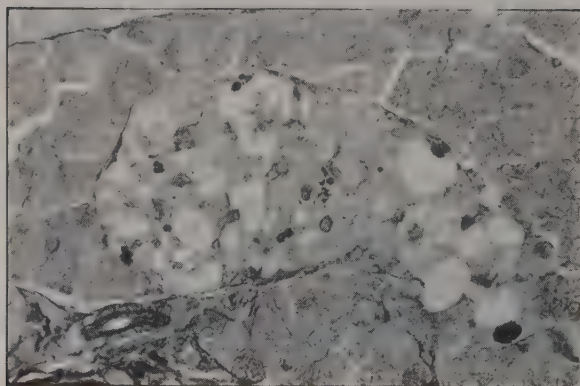


Abbildung 15

B-Zellschädigung nach 75 mg/kg (i.v.) Streptozotocin, 2 Tage. Insulinspezialfärbung: SCOTT.

Bei einigen Tieren waren überhaupt keine Langerhansschen Inseln mehr sichtbar, sondern nur noch umschriebene intralobuläre Herde aus Leukozyten, Rundzellen und Zelldetritus (Abbildung 16).

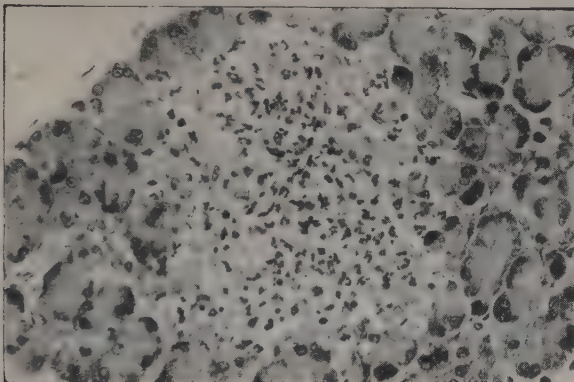


Abbildung 16

Leukozytäre Infiltration der Insel eines chinesischen Streifenhamsters nach Behandlung mit 75 mg/kg Streptozotocin. H.E. Färbung.

Hierbei dürfte es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um eine entzündliche Infiltration Langerhansscher Inseln nach vorausgegangener Degeneration handeln.

Ob auch die A-Zellen geschädigt worden sind, kann aufgrund der angewendeten Färbemethoden nicht beurteilt werden. Da diese Zellen nicht wie bei Ratten einen einheitlichen, gut abgegrenzten Mantel um die B-Zellen bilden und damit ohne weiteres zu klassifizieren sind, könnte diese Frage definitiv nur durch eine A-Zellspezialfärbung gelöst werden. Eine direkte Schädigung durch das Antibiotikum ist allerdings nicht wahrscheinlich, da an allen bisher untersuchten Tierarten nie ein derartiger Effekt beobachtet wurde. Eine indirekte Beeinträchtigung der A-Zellen ist dagegen als Folge der leukozytären Infiltration möglich. Degenerative Veränderungen des exokrinen Pancreas wurden nicht festgestellt.

24 Stunden nach i.v. Injektion von 300 mg/kg Streptozotocin wurde zwar ebenfalls eine weitgehende Degeneration der B-Zellen beobachtet, schwere Degenerationen waren jedoch erst in einzelnen Fällen sichtbar. Offensichtlich ist zur Ausprägung dieser Veränderungen ein längerer Zeitraum erforderlich.

3.3.6.

Schlußfolgerung

Diese Ergebnisse zeigen, daß Streptozotocin in einer Dosis von 75 mg/kg i.v. bei chinesischen Streifenhamstern zu einem schweren experimentellen Diabetes mellitus führt. Er ist gekennzeichnet durch einen auf einer B-Zelldegeneration beruhenden Insulinmangel mit den sich daraus für den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel ergebenden Folgen. Sie wurden durch einen Anstieg der Blutglucose, der freien Fettsäuren im Serum und der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber nachgewiesen.

3.4. UNTERSUCHUNGEN AN MEERSCHWEINCHEN

3.4.1. Injektion von Streptozotocin bei nüchternen Tieren

Die intravenöse Injektion verschiedener Dosen von Streptozotocin (50 - 200 mg/kg) führte bei Meerschweinchen, die in gleicher Weise wie Mäuse, Ratten und chinesische Streifenhamster 16 Stunden nüchtern waren, nur zu einer vorübergehenden Hyperglykämie, nicht jedoch zu einer dauernden Blutzuckersteigerung. Unter dem Einfluß von 50, 75, 90 und 100 mg/kg war die Blutzuckerkonzentration 2 Stunden nach Gabe der Substanz erhöht, nach 1, 2 und soweit gemessen auch nach 7 Tagen lag sie jedoch wieder im Normbereich, unabhängig davon, ob die Tiere zum Zeitpunkt der Blutentnahme nüchtern oder gefüttert waren. Wegen des großen Gewichtes der Meerschweinchen und des dadurch bedingten größeren Substanzbedarfs wurde für diese Untersuchungen pro Dosis nur 1 Tier verwendet (Tabelle 18).

Glucosekonzentration im Blut von Meerschweinchen nach i.v. Injektion verschiedener Dosen von Streptozotocin (n = 1).

Dosis mg/kg	Blutzuckerkonzentration (mg%)				
	nach 2 Std. nüchtern	nach 1 Tag morgens nüchtern	abends gefüttert	nach 2 Tagen gefüttert	nach 7 Tagen gefüttert
50	162,1	90,2	96,1	94,4	—
75	219,5	93,1	95,0	103,4	125,2
90	207,0	92,0	106,1	102,2	124,4
100	264,4	109,2	117,3	134,1	96,3

Tabelle 18

Ein weiterer Versuch an einem etwas größeren Tierkollektiv zeigte, daß 24 Stunden nach i.v. Injektion von 200 mg/kg Streptozotocin die Blutzuckerkonzentration bei gefütterten Tieren auf über 200 mg% gesteigert war. 75 mg/kg hatten zu diesem Zeitpunkt keine Erhöhung der Blutglucose gegenüber den Kontrollen mehr zur Folge. Nach 3 bzw. 4 Tagen war jedoch auch die Wirkung der höheren Dosis abgeklungen. Selbst bei gefütterten Tieren lag die Glucosekonzentration im Blut nur noch geringfügig über dem Kontrollniveau (Tabelle 19).

Glucosekonzentration im Blut von Meerschweinchen nach i.v. Injektion von 75 oder 200 mg/kg Streptozotocin.

$[\bar{x} \pm S_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$; $() = n$

Dosis (Zeit)	Blutglucose (mg%)	Signifikanz gegen entsprechende Ko.
Kontrollen (gefüttert)	105,5 $\pm$ 2,3 (5)	
(nüchtern)	91,5 $\pm$ 3,2 (7)	
75 mg/kg 1 Tag (gefüttert)	103,9 $\pm$ 1,6 (5)	-
200 mg/kg 1 Tag (gefüttert)	273,5 $\pm$ 45,5 (6)	++
3 Tage (nüchtern)	103,0 $\pm$ 7,6 (6)	-
4 Tage (gefüttert)	141,4 $\pm$ 14,1 (6)	-

Tabelle 19

Wegen des erhöhten Verbrauchs der Substanz, die nur im beschränkten Maße zur Verfügung stand, wurden unter diesen Bedingungen keine höheren Dosen an Meerschweinchen untersucht. Dagegen wurde in einer zweiten Versuchsserie geprüft, ob es nach den Angaben von BROSKY und LOGOTHETOPOULOS (1969) möglich ist, durch i.v. Injektion einer geringeren Dosis von Streptozotocin (150 mg/kg) nach vorheriger Erzeugung einer Hypoglykämie (Insulin) eine dauerhafte diabetische Stoffwechselstörung zu erzeugen.

3.4.2.

Injektion von Streptozotocin nach vorheriger Behandlung mit Insulin

3.4.2.1.

Blutzuckerkonzentration

Zum Zeitpunkt der i.v. Injektion von Streptozotocin betrug die Glucosekonzentration im Blut nach Gabe von Altinsulin im Mittel 24 mg%. 2 Stunden danach erhielten die Tiere Glucoselösung intraperitoneal injiziert und wurden anschließend gefüttert. Am folgenden Tage war die Blutglucose bei 3 von 8 Tieren auf über 170 mg% angestiegen, bei den übrigen Tieren wurden sehr niedrige Konzentrationen (zwischen 11 und 46 mg%) gemessen. Der Mittelwert der gesamten Gruppe lag deshalb bei 101 mg% und unterschied sich damit nicht von den Kontrollen (Tabelle 20).

Glucosekonzentration im Blut (mg%) gefütterter Meerschweinchen nach Behandlung mit 150 mg/kg Streptozotocin (i.v. Injektion nach Erzeugung einer Insulinhypoglykämie).

$[\bar{x} \pm S_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$; $() = n$

Gruppe	Blutglucose (mg%)					
	n. 1 Tag	n. 2 Tagen	n. 4 Tagen	n. 5 Tagen	n. 6 Tagen	n. 7 Tagen
Kontrollen	95,7 $\pm$ 2,6 (7)	114,0 $\pm$ 3,9 (7)	100,4 $\pm$ 4,5 (7)	114,6 $\pm$ 4,6 (7)	111,8 $\pm$ 3,7 (7)	140,1 $\pm$ 7,9 (7)
150 mg/kg	100,6 $\pm$ 37,4 (8)	272,8 $\pm$ 46,4 (6)	180,3 $\pm$ 43,4 (5)	155,6 $\pm$ 30,9 (5)	167,9 $\pm$ 21,2 (5)	174,1 $\pm$ 19,0 (5)
Signifikanz gegen Kontrollen	-	++	++	-	+	-

Tabelle 20

Den hypoglykämischen Tieren wurde intravenös Glucose injiziert. 3 Meerschweinchen überlebten und unterschieden sich in der Folgezeit bis zum Versuchsende nach 7 Tagen nicht mehr von den behandelten Tieren. Bei 2 Meerschweinchen verschlechterte sich der Allgemeinzustand, sie wurden in einem präfinaalen Zustand getötet. Bei ihnen wurde die Fettsäurekonzentration im Serum und die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Leber bestimmt sowie eine histologische Untersuchung der Bauchspeicheldrüse vorgenommen.

Am 2., 4., 5., 6. und 7. Tag nach Gabe der Substanz war die Glucosekonzentration stets erhöht. Da die Streuung in vielen Fällen größer als bei den Kontrollen war, konnten die Differenzen nicht immer statistisch gesichert werden (s. Tabelle 20).

Zur genauen Beurteilung ihrer Kohlenhydrattoleranz wurde der Verlauf der Blutzuckerkonzentration nach oraler Gabe von 2 g/kg Glucose verfolgt. In den ersten 30 min stieg bei behandelten und unbehandelten Tieren die Blutglucose in gleicher Weise an. Während jedoch normale Meerschweinchen zwischen der 30. und 60. min nur noch mit einem geringen weiteren Anstieg reagierten, nahm bei den mit Streptozotocin behandelten Tieren die Glucosekonzentration mit der gleichen Geschwindigkeit weiter zu. Auch zwischen der 60. und 120. min stiegen bei ihnen im Gegensatz zu den Kontrollen die Werte noch an (Abbildung 17, Tabelle 21). Die Glucosetoleranz war also nach Gabe von Streptozotocin eindeutig verschlechtert.

Glucosekonzentration im Blut normaler und streptozotocindiabetischer* Meerschweinchen nach oraler Gabe von 2 g/kg Glucose (* 150 mg/kg i.v., 5 Tage).

($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$; Statistik: U-Test; $- = p > 0,05$; $+ = p < 0,05$; $++ = p < 0,02$)

Gruppe	Vorwert	Diff.		Differenz				Differenz	
		n. 30 min.	0-30 min.	n. 60 min.	0-60 min.	30-60 min.	n. 120 min.	0-120 min.	60-120 min.
Kontr. (n = 7)	114,6 $\pm 4,6$	215,5 $\pm 9,6$	+ 100,9 $\pm 10,7$	261,9 $\pm 18,8$	+ 147,2 $\pm 19,5$	+ 46,3 $\pm 25,4$	168,6 $\pm 19,5$	+ 54,0 $\pm 23,2$	- 93,3 $\pm 19,9$
Strepto- zotocin (n = 5)	155,6 $\pm 30,9$	238,5 $\pm 23,2$	+ 82,9 $\pm 18,3$	366,7 $\pm 31,2$	+ 211,1 $\pm 7,0$	+ 128,2 $\pm 18,7$	394,8 $\pm 36,6$	+ 239,2 $\pm 23,9$	+ 28,1 $\pm 28,1$
Sig. geg. Kontr.	-	-	-	++	++	-	++	++	++

Tabelle 21

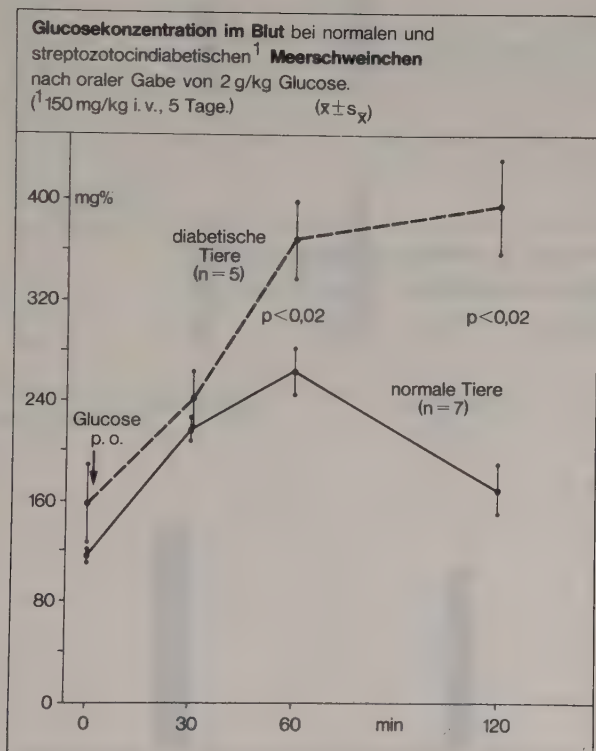


Abbildung 17

3.4.2.2.

Freie Fettsäuren im Serum

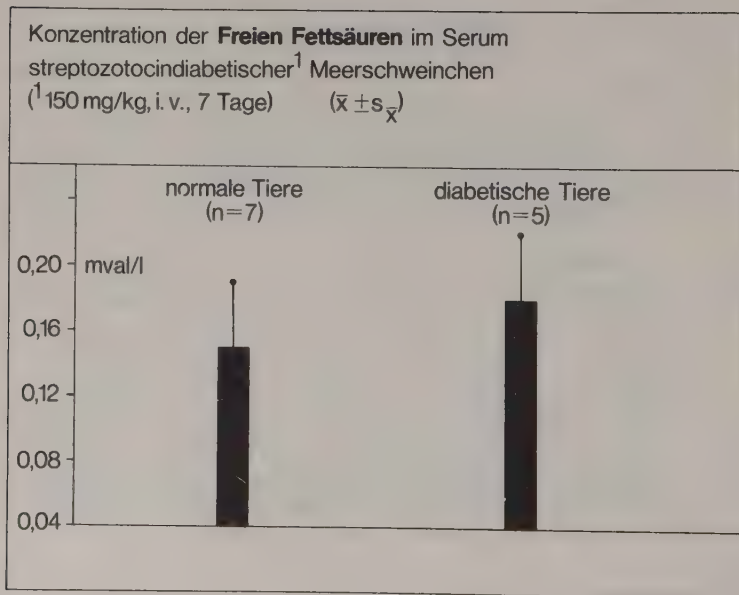
Bei den 7 Tage nach Injektion von Streptozotocin getöteten Meerschweinchen, deren Blutzuckerkonzentration zu diesem Zeitpunkt nicht erheblich über dem Kontrollwert lag, war auch die Konzentration der freien Fettsäuren im Serum nicht signifikant gesteigert (Tabelle 22, Abbildung 18). Dagegen war der Fettsäuregehalt des Serums bei den beiden nach 1 Tag untersuchten Tieren mit 0,4 und 1,2 mval/l erheblich über das Kontrollniveau angestiegen. Wegen der großen Differenz dieser beiden Werte war dieser Unterschied allerdings statistisch nicht zu sichern (s. Tabelle 22).

Konzentration freier Fettsäuren im Serum 7 Tage bzw. 1 Tag nach i.v. Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin.

$(\bar{x} \pm S_{\bar{x}}; \text{Statistik: U-Test; } - = p > 0,05; + = p < 0,05; ++ = p < 0,02; () = n)$

Gruppe (Zeit)	Freie Fettsäuren (mval/l)
Kontrollen (7 Tage)	$0,15 \pm 0,04$ (7)
150 mg/kg (7 Tage)	$0,18 \pm 0,04$ (5)
Signifikanz gegen Kontrollen	—
150 mg/kg (nach 1 Tag ++)	$0,80 \pm 0,41$ (2)
Signifikanz gegen Kontrollen	—

Tabelle 22



3.4.2.3.

Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Leber

Nach Injektion von Streptozotocin (150 mg/kg) war die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Leber sowohl bei den 7 Tage überlebenden als auch nach 24 Stunden praefinal untersuchten Meerschweinchen signifikant erhöht (Abbildung 19, Tabelle 23).

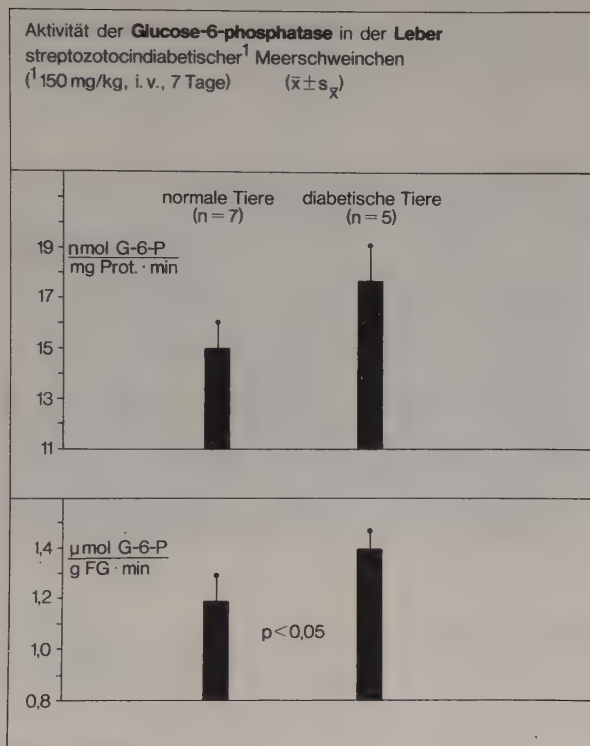


Abbildung 19

Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Leber 7 Tage bzw. 1 Tag nach Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin.

$[\bar{x} \pm S_{\bar{x}}]$; Statistik: U-Test; -- = p > 0,05; + = p < 0,05; ++ = p < 0,02; () = n]

Gruppe	Glucose-6-Phosphatase (Leber)	
	$\mu\text{mol/g FG} \times \text{min}$	$\text{nmol/mg Prot.} \times \text{min}$
Kontrollen (7 Tage)	$1,19 \pm 0,10$ (7)	$15,06 \pm 0,96$ (7)
150 mg/kg (7 Tage)	$1,40 \pm 0,07$ (5)	$17,77 \pm 1,31$ (5)
Signifikanz gegen Kontrollen	+	—
150 mg/kg (nach 1 Tag $\pm$)	$1,67 \pm 0,05$ (2)	$23,81 \pm 0,09$ (2)
Signifikanz gegen Kontrollen	++	++

Tabelle 23

Bei diesen 2 Tieren war der Anstieg höher und statistisch sowohl in bezug auf das Feuchtgewicht und den Proteingehalt signifikant. Bei den nach einer Woche getöteten Meerschweinchen war die Differenz nur in der Dimension $\mu\text{mol/g Feuchtgewicht} \cdot \text{min}$ zu sichern.

3.4.2.4.

Histologische Untersuchung der Bauchspeicheldrüse

Die Pancreasproben der Kontrolltiere waren einheitlich durch sehr zahlreiche runde oder ellipsoide, sehr gut abgegrenzte Inseln aller Größenordnungen mit starker diffuser Granulierung der B-Zellen und einer A:B Relation von 1: 5 gekennzeichnet. In der Anfärbung mit Chromalaun-Gallocyanin nach BOCK sind die granulierten B-Zellen schwarz dargestellt. Die helleren A-Zellen sind nicht wie bei Ratten in Form einer Randschale angeordnet, sondern liegen in Gruppen zwischen den B-Zellen (Abbildung 20).

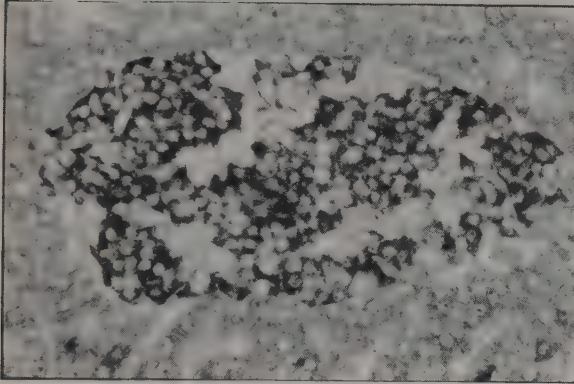


Abbildung 20

Langerhanssche Insel eines normalen Meerschweinchens mit granulierten B-Zellen (schwarz) und Gruppen von A-Zellen (hell).

Färbung: Chromalaun-Gallocyanin nach BOCK.

Dagegen waren in den Pankreasproben der beiden 24 Stunden nach Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin untersuchten Meerschweinchen die kleinen Inseln unregelmäßig geformt, undeutlich abgegrenzt und schwer zu identifizieren, die mittelgroßen und großen jedoch gut vom sekretorischen Gewebe abgegrenzt und erkennbar. In allen Inseln wurden überwiegend B-Zellen mit schweren degenerativen Veränderungen in Form von Karyopyknose, Karyorrhexis, Karyolyse, Schwunde der Zellgrenzen und Verdichtung des Zytoplasmas angetroffen, die von dicht liegenden granulären Massen überlagert waren (Abbildung 21).

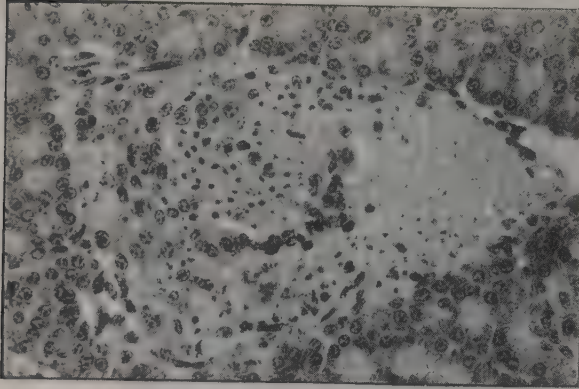


Abbildung 21

Pyknotische Kerne und granuläre Massen anstelle von B-Zellen in der Insel eines Meerschweinchens nach Streptozotocininjektion (i.v. 150 mg/kg, 2 Tage).
Färbung: H.E.

Die Abbildung 22 (Insulinspezialfärbung nach BOCK) zeigt, daß es sich bei diesen Massen offenbar um Reste granulär gebundenen Insulins aus den zugrunde gegangenen B-Zellen handelt. Zahl und Morphologie der A-Zellen erschienen in allen Inseln unverändert (s. Abbildung 21 und 22).

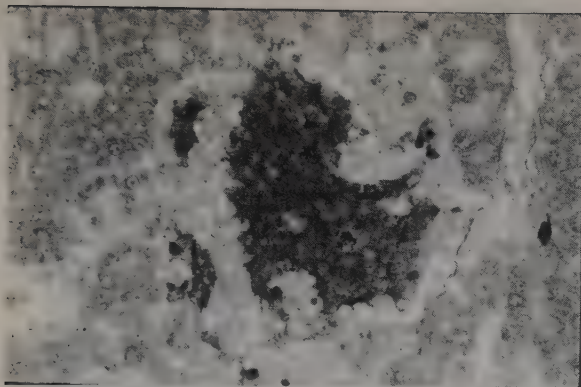


Abbildung 22

Schwarze Granulamassen anstelle der B-Zellen in der Langerhansschen Insel eines Meerschweinchens.

Färbung: Chromalaun-Gallocyanin nach BOCK.

In den Pankreasproben der nach 7 Tagen getöteten Meerschweinchen erschien die Inselzahl reduziert. Es wurden runde, ellipsoide oder unregelmäßige Inseln aller Größenordnungen angetroffen, die entweder gut oder undeutlich vom sekretorischen Gewebe abgegrenzt waren. Die B-Zellen waren überwiegend schwach oder mittelgradig und nur vereinzelt stark granuliert. Morphologisch faßbare Anzeichen von B-Zellnekrosen waren nicht erkennbar. Es bestand jedoch eine Verschiebung der A:B Relation zu Gunsten der A-Zellen (1:1 bis 3:1), die auf eine numerische Verminderung der B-Zellen hinwies.

3.4.2.5.

Schlußfolgerung

Die intravenöse Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin führt bei Meerschweinchen mit einer Insulinhypoglykämie zu einem experimentellen Diabetes mellitus, der auf einer Degeneration und damit einer Verminderung von B-Zellen in den Langerhansschen Inseln beruht. Die morphologischen und einige biochemische Veränderungen (Anstieg der Konzentration freier Fettsäuren im Serum und der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber) waren bei 2 im akuten Stadium zugrunde gegangenen Tieren am stärksten ausgeprägt. Meerschweinchen, die die ersten 24 Stunden überlebten, zeigten eine mäßige Hyperglykämie, pathologische Glukosetoleranz und eine geringe Erhöhung der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber.

3.5.

STICHVERSUCH AN KANINCHEN

Bisher veröffentlichte Befunde haben gezeigt, daß Streptozotocin in einer Dosis von 65 oder 130 mg/kg bei Kaninchen in gleicher Weise wie bei Meerschweinchen keine diabetische Wirkung besitzt, wenn die Substanz gefütterten Tieren injiziert wird. Es sollte daher geprüft werden, ob diese Resistenz entsprechend den Erfahrungen an Meerschweinchen auch bei dieser Tierart durch vorherige Erzeugung einer Insulinhypoglykämie durchbrochen werden kann.

Da die vorhandene Substanzmenge zur Behandlung einer größeren Tierzahl ausgewachsener Tiere nicht mehr ausreichte, wurde ein Stichversuch an einem infantilen Kaninchen im Gewicht von 500 g durchgeführt und mit einem gleich schweren Kontrolltier verglichen.

Nach Erzeugung einer Insulinhypoglykämie wurde Streptozotocin in einer Dosis von 150 mg/kg i.v. injiziert. Zwei Stunden danach erhielten die Tiere Glucoselösung i.v. und wurden anschließend gefüttert. Einen Tag später verstarb das behandelte Tier akut, ohne daß vorher noch Blut für biochemische Untersuchungen abgenommen werden konnte. Die Untersuchung mußte sich daher auf eine histologische Beurteilung der Bauchspeicheldrüse beschränken.

Auf der Abbildung 23 ist eine mit Hämatoxylin-Eosin gefärbte, intakte, gut gegen das exokrine Pankreas abgegrenzte Langerhanssche Insel des Kontrolltieres dargestellt.

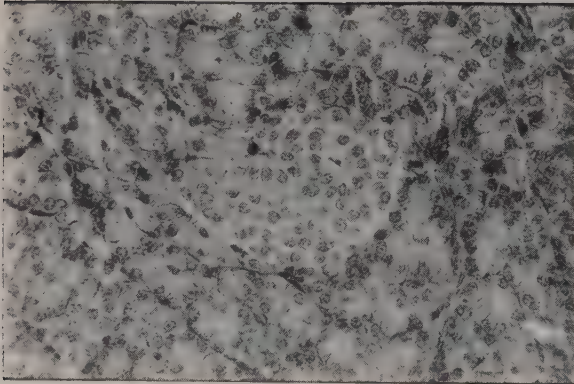


Abbildung 23
Normale Langerhanssche Insel eines Kaninchens.
Färbung: H.E.

Auf der Spezialfärbung nach SCOTT (Abbildung 24) sieht man, daß die bei diesem Tier mäßig granulierten B-Zellen keinen zusammenhängenden Kern bilden, wie dies bei Ratten der Fall ist.

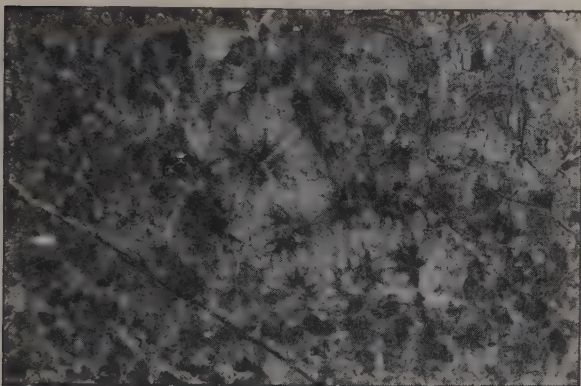


Abbildung 24
Unveränderte B-Zellen. Färbung: SCOTT.



24 Stunden nach Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin war es zu einer allgemeinen Nekrose der B-Zellen gekommen. Auf den Abbildungen 25 (H.E.) und 26 (SCOTT) erkennt man nur noch geschrumpfte, degranulierte B-Zellen mit pyknotischen Kernen, während die dazwischen liegenden A-Zellen sowie das umgebene exokrine Pancreas unverändert erscheinen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß Streptozotocin auch bei Kaninchen grundsätzlich beta-zytotoxisch wirkt.

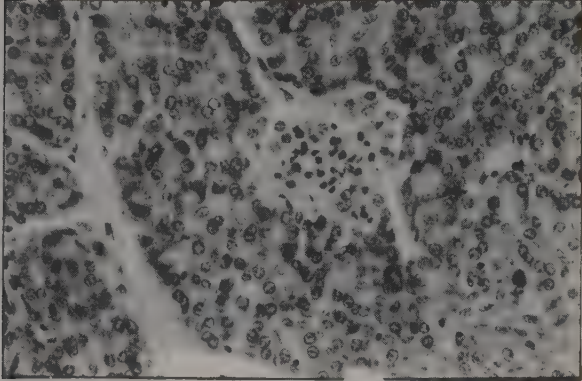


Abbildung 25

Pyknose und Zellschrumpfung der B-Zellen in der Langerhansschen Insel eines Kaninchens nach Behandlung mit Streptozotocin (150 mg/kg, i.v.). Färbung: H.E.

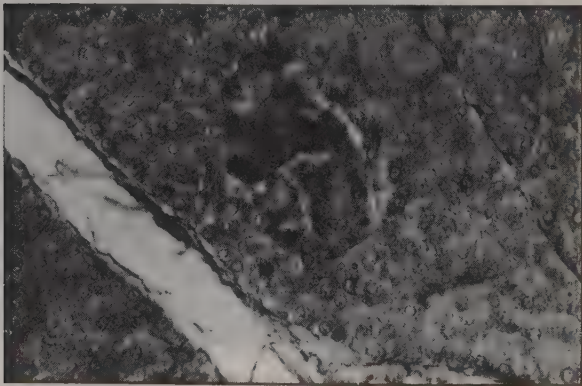


Abbildung 26

Wie Abbildung 25, Färbung: SCOTT.

4. DISKUSSION

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen die in der Literatur mitgeteilten Befunde, nach denen Streptozotocin bei verschiedenen Tierarten zu einer Zerstörung der B-Zellen in den Langerhansschen Inseln und damit zu einem Insulinmangel-diabetes führt. Dies wurde an Ratten, chinesischen Streifenhamstern und Meerschweinchen durch morphologische Veränderungen der Bauchspeicheldrüse und den biochemischen Nachweis einer Einschränkung der Insulininkretion mit den sich daraus für den Fett- und Kohlenhydratstoffwechsel ergebenden Folgen eindeutig nachgewiesen. Aus der Erniedrigung des Seruminsulins und der Erhöhung der Blutzuckerkonzentration nach intravenöser Injektion von Streptozotocin bei Mäusen ist in Übereinstimmung mit histologischen Untersuchungen anderer Autoren (BROSKY und LOGOTHETOPOULOS, 1969) für diese Tierart eine gleiche Wirkung der Substanz anzunehmen.

Da außerdem die Versuche an Ratten gezeigt haben, daß das Ausmaß des Insulinmangels von der injizierten Dosis abhängt, ist Streptozotocin grundsätzlich zur routinemäßigen Erzeugung eines Diabetes mellitus von definiertem Schweregrad geeignet. Ein schweres diabetisches Syndrom tritt bei Ratten und chinesischen Streifenhamstern nach i.v. Injektion von 75 mg/kg, Mäusen 200 mg/kg und Meerschweinchen 150 mg/kg auf. Entgegen den Beobachtungen von KUSHNER, LAZAR, FURMAN, LIEBERMAN und LEOPOLD (1969), die bei Meer- -schweinchen selbst durch eine Behandlung mit 300 mg/kg keine Hyperglykämie erzeugen konnten, bestehen offensichtlich zwischen den untersuchten Tierarten keine grundsätzlichen Unterschiede. Die Wirkung der Substanz hängt davon ab, unter welchen Bedingungen sie bei den verschiedenen Species appliziert wird. Während bei Mäusen, Ratten und chinesischen Streifenhamstern die Injektion nach sechzehnstündigem Futterentzug erfolgen kann, ist bei Meerschweinchen die vorherige Erzeugung einer Insulinhypoglykämie erforderlich. Daß diese Maßnahme ebenfalls nicht auf grundlegende Differenzen hinweist, geht aus einer Beobachtung von BROSKY und LOGOTHETOPOULOS (1969) hervor. Diese Autoren berichten, daß bei Mäusen die zur Erzeugung eines schweren Diabetes mellitus notwendige Dosis auf 60 mg/kg reduziert werden konnte, wenn die Tiere vorher mit Insulin behandelt wurden. Worauf die erhöhte Ansprechbarkeit der B-Zellen gegenüber Streptozotocin nach Injektion von exogenem Insulin beruht, ist bisher nicht geklärt. Unter Umständen spielt die Höhe des Insulingehalts in den Zellen hierfür eine wesentliche Rolle. Da die Insulininkretion bei Anstieg des Hormons in der umgebenden extrazellulären Flüssigkeit abnimmt (FRERICHS, REICH und CREUTZFELDT, 1965), kann man annehmen, daß nach Injektion hoher Dosen exogenen Insulins die Insulinsekretion stark eingeschränkt ist. Eine Verminderung der Insulinabgabe als Folge der erniedrigten Glucosekonzentration im Blut tritt in geringerem Maße auch nach Futterentzug auf. Umgekehrt kommt es zu einer totalen Abgabe des gesamten, granulär gespeicherten Insulins, wenn durch Injektion von Insulinantikörpern das sezernierte Hormon inaktiviert wird und die hieraus resultierende sehr starke Blutzuckersteigerung über lange Zeit anhält. (LOGOTHETOPOULOS, DAVIDSON, HAIST und BEST, 1965). Unter diesen Bedingungen wird die diabetogene Wirkung von Streptozotocin bei Mäusen stark abgeschwächt (BROSKY und LOGOTHETOPOULOS, 1969).

Der wesentliche Unterschied zwischen Meerschweinchen einerseits und Mäusen sowie Ratten andererseits scheint in der unterschiedlichen regenerativen Fähigkeit der B-Zellen zu beruhen. Während bei allen untersuchten Tierarten nach ein oder zwei Tagen schwere morphologische bzw. biochemische Veränderungen nachgewiesen werden konnten, traten im weiteren Verlauf deutliche Differenzen hervor. Sieben Tage nach intravenöser Injektion von 150 mg/kg Streptozotocin bestanden bei Meerschweinchen gegenüber den Kontrollen erheblich geringere Unterschiede in der Blutzuckerkonzentration, der Aktivität der Glucose-6-Phosphatase in der Leber und des Fettsäuregehaltes im Serum als bei den nach vierundzwanzig Stunden untersuchten Tieren. Im Vergleich mit den schweren, fast totalen B-Zellnekrosen, die nach einem Tag beobachtet wurden, waren bei diesen Tieren relativ viele intakte B-Zellen nachweisbar. Auf eine erhöhte regenerativen Fähigkeit der B-Zellen von Meerschweinchen wurde bereits von JOHNSON (1950) hingewiesen. Zur Erzielung eines länger anhaltenden Diabetes mellitus scheint es also bei diesen Tieren erforderlich zu sein, durch Streptozotocin eine möglichst weitgehende Zerstörung aller B-Zellen zu erreichen, um die Möglichkeit einer

Restitution gering zu halten. Hierfür sprechen Ergebnisse von BROSKY und LOGOTHETOPOULOS (1969), die noch nach acht Monaten keine Besserung des diabetischen Syndroms von Meerschweinchen beobachteten, deren B-Zellsystem weitgehend zerstört war. Das Auftreten einer nur vorübergehenden Hyperglykämie bei Tieren, deren Empfindlichkeit gegenüber Streptozotocin nicht durch vorherige Injektion durch Insulin gesteigert wurde, kann daher durch eine B-Zellzerstörung geringeren Grades mit nachfolgender schneller Regeneration erklärt werden. Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen dürfte die Erzeugung eines abgestuften experimentellen Diabetes mellitus zumindest über längere Zeit nicht möglich sein. Ähnliche Verhältnisse treffen möglicherweise für Kaninchen zu. Aufgrund ihrer Ergebnisse folgten KUSHNER, LAZAR, FURMAN, LIEBERMAN und LEOPOLD (1969), daß diese Tiere ebenfalls gegenüber Streptozotocin „resistent“ sind. Der vorliegende Stichversuch weist aber darauf hin, daß auch bei dieser Tierart durch das Antibiotikum eine B-Zellzerstörung möglich ist. Zur Aufklärung dieser Diskrepanz sind biochemische und histologische Untersuchungen nach verschiedener Einwirkungsdauer der Substanz erforderlich.

Bei Ratten und Mäusen kann man demgegenüber mit einer geringen Regeneration der B-Zellen nach Injektion von Streptozotocin rechnen. Darauf wurde bereits in der Einleitung hingewiesen. Bisher nicht veröffentlichte Ergebnisse an chronisch streptozotocindiatetischen Ratten bestätigen diese Befunde (LOSER und KRAAZ, 1970). Vierzehn Tage nach i.v. Injektion von 80 mg/kg Streptozotocin war bei Tieren, die in der Zwischenzeit mit Insulin substituiert wurden, nach Absetzen des Hormons die diabetische Stoffwechselstörung genauso schwer wie am zweiten Tag nach Gabe des Antibiotikums. Bei geringerer Regenerationsneigung kann man auch erwarten, daß ein durch niedrige Dosen verursachter leichter oder mittelstarker Diabetes mellitus über längere Zeit unverändert bleibt. JUNOD, LAMBERT, STAUFFACHER und RENOLD (1969) konnten zeigen, daß der mehr oder weniger stark reduzierte Insulingehalt der Bauchspeicheldrüse von Ratten, die verschiedene Dosen von Streptozotocin erhalten hatten, sich im Verlaufe eines Monats nicht änderte. Derartige Tiere sind als Modell zur Beurteilung der Wirkung antidiabetischer Pharmaka bei chronischer Verabreichung von großem Nutzen.

Auf welche Weise Streptozotocin in den Stoffwechsel der B-Zellen eingreift, ist noch nicht eindeutig geklärt. Der biphasische Ablauf der nach i.v. Injektion auftretenden Blutglucoseveränderungen weist darauf hin, daß die Substanz offenbar zwei verschiedene Wirkungen auf die B-Zellen ausübt. Untersuchungen von CREUTZFELDT, FRERICHS und CREUTZFELDT (1969) haben gezeigt, daß Langerhanssche Inseln von Ratten, die eine Stunde nach Behandlung mit Streptozotocin isoliert wurden, in vitro auf einen Glucosezusatz nicht mit einer Insulinausschüttung reagieren. Daraus wurde geschlossen, daß die primäre Hyperglykämie, die zu einem Zeitpunkt auftritt, zu dem noch keine Degranulation und andere deutliche morphologische Veränderungen der B-Zellen sichtbar sind (JUNOD, LAMBERT, ORCI, PICTET und GONET, 1967), auf einer Hemmung der Insulinabgabe beruht. Die nachfolgende Hypoglykämie geht mit einem starken Anstieg des Seruminsulins, einer Abnahme des Insulingehaltes der Bauchspeicheldrüse und histologisch nachweisbaren Nekrosen der B-Zellen einher (JUNOD, LAMBERT, ORCI, PICTET und GONET, 1967; JUNOD, LAMBERT, STAUFFACHER und RENOLD, 1969; STAUFFACHER, BURR, GUTZEIT, BEAVEN, VELEMINSKY und RENOLD, 1970). Zu diesem Zeitpunkt bewirkt die Substanz demnach eine Freisetzung des gesamten, granulär gespeicherten Insulins. Die im weiteren Verlauf auftretende permanente Hyperglykämie ist dann die Folge des Unterganges des B-Zellsystems. Sowohl die anfängliche Insulinsekretionshemmung als auch die darauf folgende Zerstörung der B-Zellen durch Streptozotocin beruht offenbar auf einem gemeinsamen Mechanismus. Beide Effekte können bei Ratten durch gleichzeitige Gabe von Nicotinsäureamid verhindert werden (STAUFFACHER, BURR, GUTZEIT, BEAVEN, VELEMINSKY und RENOLD, 1970). Eine Aufhebung der beta-zytotoxischen Wirkung wurde bei Mäusen und Ratten auch beobachtet, wenn das Derivat der Nicotinsäure 15 min vor oder 15 bis 120 min nach Applikation von Streptozotocin injiziert wurde. Der Diabetes mellitus wurde jedoch nicht verhindert, wenn die Tiere Nicotinsäureamid erst vier Stunden nach dem Antibiotikum erhielten (SCHEIN, COONEY und VERNON, 1967; SCHEIN und

BATES, 1968; DULIN und WYSE, 1969; JUNOD, LAMBERT, STAUFFACHER und RENOLD, 1969; DULIN und WYSE, 1969; STAUFFACHER, BURR, GUTZEIT, BEAVEN, VELEMSKY und RENOLD, 1970). Da Streptozotocin bei Mäusen den Nicotinsäureadeninindinucleotidgehalt (NAD) der Leber und verschiedener Tumoren reduzierte und dieser Effekt durch Nicotinsäureamid aufgehoben werden konnte (SCHEIN, COONEY und VERNON, 1967), wurde diskutiert, daß die diabetogene Wirkung der Substanz durch eine — bei Applikation von Nicotinsäureamid reversible — Abnahme der NAD-Konzentration in den B-Zellen hervorgerufen wird, entweder als Folge einer eingeschränkten Synthese oder eines erhöhten Abbaues (SCHEIN, COONEY und VERNON, 1967; SCHEIN und BATES, 1968; DULIN und WYSE, 1969; DULIN und WYSE, 1969). Der Effekt von Streptozotocin würde damit letzten Endes auf einer Störung des zellulären Wasserstofftransportes und damit auch der Zellatmung beruhen. Bei Richtigkeit dieser Annahme wäre zu fordern, daß die Erniedrigung des NAD-Gehaltes in den Inseln erheblich stärker als in anderen Organen ist oder das B-Zellsystem auf eine NAD-Verminderung empfindlicher reagiert als andere Gewebe, da nach Applikation diabetogener Dosen von Streptozotocin kaum Veränderungen in der Leber auftreten (JUNOD, LAMBERT, ORCI, PICTET, GONET und RENOLD, 1967).

Unklar ist allerdings, warum der Effekt von Streptozotocin außer durch Nicotinsäureamid nicht auch durch NAD selbst aufgehoben werden kann (DULIN und WYSE, 1969). Beide Substanzen sind in der Lage, die Toxizität von 3-Acetylpyridin herabzusetzen (KAPLAN, GOLDIN, HUMPHREYS, CIOTTI und VERIDITTI, 1954), einer Verbindung, die anstelle von Nicotinsäureamid unter Bildung von 3-Acetylpyridinadeninindinucleotid (3-APAD) bzw. 3-Acetylpyridinadeninindinucleotidphosphat (3-APADP) in die Co-Enzyme der Dehydrogenasen eingebaut wird (KAPLAN, GOLDIN, HUMPHREYS, CIOTTI und VERIDITTI, 1954). Diese pathologisch strukturierten Pyridinnucleotide sind in geringerem Maße als die natürlichen Analoga in der Lage, als Wasserstoffüberträger zu fungieren (HERKEN, 1965 und 1966; s. dort weitere Literatur) und führen damit ebenfalls zu einem funktionellen Mangel an NAD bzw. NADP. Die nach Applikation von 3-Acetylpyridin auftretenden Schäden betreffen im wesentlichen das Zentralnervensystem (HERKEN, 1965). Möglicherweise beruht die unterschiedliche protektive Wirkung von exogenem NAD bei Behandlung mit 3-Acetylpyridin oder Streptozotocin darauf, daß die Permeabilität der B-Zellen für das Nucleotid geringer ist als derjenigen Zellen, die in erster Linie durch 3-Acetylpyridin geschädigt werden.

Die Annahme einer Verminderung des NAD-Gehaltes der B-Zellen als Ursache der diabetogenen Wirkung von Streptozotocin ist auch noch mit einer anderen Beobachtung nicht ohne weiteres in Übereinstimmung zu bringen. Außer 3-Acetylpyridin wurde mit 6-Aminonicotinsäureamid (6-AN) ein zweiter Antimetabolit des Nicotinsäureamids beschrieben, der in vivo zur Bildung abnorm strukturierter Pyridinnucleotide führt (DIETRICH, FRIEDLAND und KAPLAN, 1958). Im Gegensatz zu 3-APAD und 3-APADP können die entsprechenden 6-AN haltigen Analoga (6-ANAD, 6-ANADP) überhaupt nicht reduziert werden und behindern darüber hinaus die Wirkung der natürlichen Co-Enzyme (COPER und NEUBERT, 1964). 6-AN führt zu Funktionsstörungen verschiedener Organe (HERKEN, 1966, s. dort weitere Literatur) und beeinträchtigt auch den Kohlenhydratstoffwechsel (v. BRUCHHAUSEN, 1965). Durch Steigerung der Catecholaminfreisetzung aus der Nebenniere (SCHACHT, SCHULTZ und SENFT, 1966) und Hemmung des insulinabhängigen Glucosetransportes in der Skelettmuskulatur (SCHULTZ, SENFT, LOSERT und SCHACHT, 1966; SITT, LOSERT, SCHULTZ, KAESS und SENFT, 1966) kommt es zu einer Erhöhung der Blutzuckerkonzentration. Eine Beeinträchtigung der Insulinabgabe ist dagegen nicht an der durch 6-AN verursachten Hyperglykämie beteiligt. Die durch Glucose stimulierbare Insulinabgabe ist nach Gabe von 6-AN sogar gesteigert (SITT, LOSERT, SCHULTZ, KAESS und SENFT, 1966). Zwar wurde bisher nicht untersucht, ob der Antimetabolit in die Pyridinnucleotide der B-Zellen eingebaut wird und dort zu einer funktionellen Verminderung der wasserstoffübertragenden Co-Fermente führt. Die Tatsache, daß die durch Glucose stimulierbare Insulinsekretion nach Gabe von 6-AN sogar gesteigert ist (SITT, LOSERT, SCHULTZ, KAESS und SENFT, 1966), weist aber darauf hin, daß die Substanz in irgend einer Weise in den Stoff-

wechsel der B-Zellen eingreift. Die entgegengesetzte Wirkung eines prinzipiell gleichartigen Eingriffs in den Stoffwechsel (NAD-Verminderung durch 6-AN oder Streptozotocin) wäre nur dann zu erklären, wenn beide Verbindungen diesen Effekt in verschiedenen Teilen der Zelle ausüben. Von anderem Gewebe ist bekannt, daß 6-AN fast ausschließlich in die extramitochondralen Pyridinnucleotide eingebaut wird (HERKEN und NEUHOFF, 1964). Möglicherweise führt eine derartige Veränderung wie in der Niere und Leber (HERKEN, SENFT und ZEMISCH, 1964; HERKEN, SENFT und ZEMISCH, 1966; SENFT, LOSERT, SITT, McEVOY und KAESS, 1966) auch in der B-Zelle zu einer Störung des Natriumtransportes. Untersuchungen von MILNER und HALES (1967) haben gezeigt, daß die Insulinabgabe unter Versuchsbedingungen ansteigt, die mit einer Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration in der B-Zelle einhergeht. Unter Berücksichtigung dieser Vorstellungen wäre es möglich, daß Streptozotocin eine Verminderung der intramitochondralen Pyridinnucleotide bewirkt und damit über eine Vergiftung des oxydativen Stoffwechsels zu einer Zerstörung der B-Zellen führt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1.

An Mäusen, Ratten, chinesischen Streifenhamstern, Meerschweinchen und — im Rahmen eines Stichversuches — Kaninchen wurde die diabetogene Wirkung von Streptozotocin, einem Antibiotikum aus *Streptomyces acromogenes* untersucht. Die Beurteilung des Substanzeffektes erfolgte durch histologische Untersuchung der Bauchspeicheldrüse und Bestimmung einer Reihe biöchemischer Parameter, die bei einem Diabetes mellitus verändert werden (Blutzuckerkonzentration, Insulinkonzentration im Serum und ihre Beeinflussung durch Glucose und Glykodiadin, Konzentration der freien Fettsäuren im Serum, der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber, Oxydation von ^{14}C -U-Glucose zu $^{14}\text{CO}_2$). Bei allen untersuchten Tierarten konnten Anzeichen einer beta-zytotoxischen Wirkung der Verbindung nachgewiesen werden. Die diabetogenen Dosen sowie die Bedingungen, unter denen die Substanz wirksam ist, differierten jedoch zwischen den verschiedenen Species.

5.2.1.

Bei Mäusen wurde eine permanente Hyperglykämie durch i.v. Injektion von 200 oder 300 mg/kg Streptozotocin erzeugt. Sie ging mit einer Hemmung der durch Glucose stimulierbaren Insulinkretion einher.

5.2.2.

Bei Ratten hatte die i.v. Injektion von 75 oder 80 mg/kg der Substanz eine sichere diabetogene Wirkung. Außer einem Blutzuckeranstieg wurde eine Steigerung der Konzentration freier Fettsäuren im Serum und der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber, eine Erniedrigung der Oxydation von Glucose zu CO_2 und der Insulinkonzentration gemessen. Die Bauchspeicheldrüse reagierte weder auf Glucose noch auf Glykodiadin mit einer Insulinausschüttung. 20-60 mg/kg hatten eine dosisabhängig schwächere Wirkung, eine Steigerung auf 150 mg/kg führte nicht zu einer weiteren Verstärkung des Effektes. Histologisch fanden sich degenerative Veränderungen der B-Zellen.

5.2.3.

Bei chinesischen Streifenhamstern kam es ebenfalls unter dem Einfluß von 75 mg/kg (i.v.) zu einem schweren Diabetes mellitus, der durch ausgedehnte Nekrosen der B-Zellen — teilweise mit leukozytärer Infiltration der Inseln — charakterisiert war. Als Folge des Insulinmangels war die Blutzuckerkonzentration, der Gehalt der freien Fettsäuren im Serum und die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase gesteigert. Eine Erhöhung der Dosis auf 300 mg/kg hatte keine wesentliche Verstärkung des Effektes zur Folge.

5.2.4

Bei Meerschweinchen war eine dauerhafte Hyperglykämie durch Streptozotocin nur dann zu erzeugen, wenn die Substanz nach vorheriger Erzeugung einer Insulinhypoglykämie injiziert wurde. Unter diesen Bedingungen führten 150 mg/kg zu einem

diabetischen Syndrom, das durch degenerative Veränderungen der B-Zellen, eine pathologische Glucosetoleranz sowie einen Anstieg der Glucose-6-Phosphatase-Aktivität in der Leber und der freien Fettsäuren im Serum gekennzeichnet war. Wurde Streptozotocin ohne Vorbehandlung mit Insulin appliziert, trat auch unter dem Einfluß höherer Dosen nur ein vorübergehender Blutzuckeranstieg auf.

5.2.5.

Eine Degeneration von B-Zellen wurde auch bei einem Kaninchen beobachtet, daß nach vorheriger Injektion von Insulin 150 mg/kg Streptozotocin erhalten hatte. Ausgedehnte Versuche konnten an dieser Tierart infolge eines Substanzmangels nicht durchgeführt werden.

5.3.

Bei Experimenten an Ratten konnte ein Ablauf der Streptozotocinwirkung in mehreren Phasen unterschieden werden. Nach einer primären, innerhalb einer Stunde einsetzenden Hyperglykämie, die nach den Ergebnissen anderer Autoren auf einer Hemmung der Insulinabgabe beruhen soll, kam es nach fünf Stunden zu einer Zerstörung der B-Zellen, die als Folge einer Freisetzung des gesamten gespeicherten Insulins zu einem Abfall der Blutglucose führte. Danach trat eine durch den Insulinmangel bedingte permanente Hyperglykämie auf. Bei allen untersuchten Tieren war nach vierundzwanzig Stunden dieses Stadium voll ausgeprägt.

5.4.

Als Ursache des beta-zytotoxischen Effekts wurde aufgrund von Literaturhinweisen eine Störung des intrazellulären Wasserstofftransportes diskutiert, die auf einer durch Streptozotocin verursachten Abnahme der NAD-Konzentration beruhen soll.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ARISON, R.N., and E.L. FEUDALE: Induction of renal tumor by streptozotocin in rats. *Nature* 214, 1254 (1967).
2. ARISON, R.N., E.I. CIACCIO, M.S. GLITZER, J.A. CASSARO, and M.P. PRUSS: Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes* 16, 51 (1967).
3. BECKMANN, R.: Zur Pharmakodynamik der Biguanide. 2. Internationales Biguanid-Symposium, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1968).
4. BOCK, R. und H. ULLMANN: Zur Darstellung der B-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Hundes und der Ratte mit Chromalaun-Gallocyanin. *Acta histochem.* 27, 70 (1967).
5. BOQUIST, L.: Morphology of the pancreatic islets of the non-diabetic adult chinese hamster, *Cricetus griseus*. *Acta. Soc. Med. Uppsala*. 72, 331 (1968).
6. BROSKY, G., J. LOGOTHETOPOULOS: Streptozotocin diabetes in the mouse and guinea pig. *Diabetes* 18, 9:606 (1969).
7. BRUCHHAUSEN, F. von: Zum Mechanismus der Hyperglykämie bei der 6-Aminonicotinamidvergiftung der Ratte. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmac.* 250, 241 (1965).
8. BUTLER, L.: The inheritance of diabetes in the chinese hamster. *Diabetologia* 3, 124 (1967).
9. CAHILL, G.F., Jr., B. LEBOEUF, and R.B. FLINN: Studies on rat adipose tissue in vitro. VI. Effect of epinephrine on glucose metabolism. *J. Biol. Chem.* 235, 1246 (1960).
10. CARPENTER, A.M., G.C. GERRITSEN, W.E. DULIN, A. LAZAROW: Islet and β -cell volumes in diabetic chinese hamsters and their non diabetic siblings. *Diabetologia* 3, 92 (1967).
11. COLLENS, W.S., and J.R. MURLIN: Hyperglycemia following the portal injection of insulin. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 26, 485 (1928/29).
12. COLOWICK, S.P., G.T. CORI, and M.W. SLEIN: The effect of adrenal cortex and anterior pituitary extracts and insulin on the hexokinase reaction. *J. Biol. Chem.* 168, 583 (1947).
13. COPER, H. und D. NEUBERT: Einfluß von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit einiger NADP-bedürftiger Oxydoreduktasen. *Biochim. Biophys. Acta* 89, 23 (1964).
14. CREUTZFELDT, W.: Zur Histophysiologie des Inselapparates. *Z. Zellforsch.* 34, 280 (1949).
15. CREUTZFELDT, W., H. FRERICH, and C. CREUTZFELDT: In: J. OSTMAN: „Diabetes“, p. 110, Excerpta Med. Foundation, Amsterdam (1969).

16. CROFFORD, O.B., and A.E. RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 240, 3237 (1965).
17. DIETRICH, L.S., I.M. FRIEDLAND, and L.A. KAPLAN: Pyridine nucleotide metabolism: Mechanism of action of the niacin antagonist 6-aminonicotinamide. *J. Biol. Chem.* 233, 964 (1958).
18. DUFF, G.L.: The pathology of the pancreas in experimental diabetes mellitus. *Amer. J. Med. Sc.* 210, 381 (1945).
19. DULIN, W.E., and B.M. WYSE: Reversal of streptozotocin diabetes with nicotinamide (33707). *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 130, 992 (1969).
20. DULIN, W.E., and B.M. WYSE: Studies on the ability of compounds to block the diabetogenic activity of streptozotocin. *Diabetes* 18, 459 (1969).
21. DUNCOMBE, W.C.: The colorimetric micro-determination of long-chain fatty acids. *Biochem. J.* 88, 7 (1963).
22. DUNN, J.S., H.L. SHEEHAN, and H.G.B. McLEITCHIE: Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. *Lancet* 244, 484 (1943).
23. DUNN, D.F., B. FRIEDMANN, A.R. MAASS, A. REICHARD, and S. WEINHOUSE: Effect of insulin on bloodglucose in try and removal rates in normal dogs. *J. Biol. Chem.* 225, 225 (1957).
24. ENGEL, F.L., and J.E.Jr. WHITE: Some hormonal influences on fat mobilization from adipose tissue. *Amer. J. Clin. Nutr.* 8, 691 (1960).
25. EVANS, J.S., G.C. GERRITSEN, K.M. MANN, and ST. P. OWEN: Antitumor and hyperglycemic activity of streptozotocin (NSC 37917) and its cofactor, U-15, 774. *Cancer Chemotherapy Rept.* 48, 1 (1965).
26. FAIN, J.N., V.P. KOVACEV, and R.O. SCOW: Antilipolytic effect of insulin in isolated fat cells of the rat. *Endocrinology* 78, 773 (1966).
27. FISKE, C.H., P. SUBBAROW: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chemistry* 66, 375 (1925).
28. FRERICH, H. und W. CREUTZFELDT: Diabetes durch Beta-Zytotoxine. In: PFEIFFER, E.F.: *Handbuch des Diabetes mellitus*. Band I, 811 (1969).
29. FRERICH, H., U. REICH und W. CREUTZFELDT: Insulinsekretion in vitro. I. Hemmung der glucoseinduzierten Insulinabgabe durch Insulin. *Klin. Wschr.* 43, 136 (1965).
30. GERRITSEN, G.C., and W.E. DULIN: Characterization of diabetes in the chinese hamster. *Diabetologia* 3, 74 (1967).
31. GOMORI, G.: Aldehyde-fuchsin: a new stain for elastic tissue. *Amer. J. Clin. Path.* 20, 665 (1950).
32. HAACKE, H.: Erzeugung eines Diabetes mellitus unterschiedlichen Schweregrades mittels Streptozotocin. *Klin. Wschr.* 47. Jg. 8, 437 (1969).

33. HALPERN, B.N.,
F. PACAUD: Technique de prélèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction de plexus ophthalmique.
C.R.Soc. Biol. (Paris) 145, 1465 (1951).
34. HARPER, A.E.: Glucose-6-phosphatase. In: BERGMAYER, H.U.: Methode der enzymatischen Analyse. Weinheim: Verlag Chemie (1962).
35. HENDERSON, M.J.,
H.E. MORGAN, and
C.R. PARK: Regulation of glucose uptake in muscle.
J. Biol. Chem. 236, 2157 (1961).
36. HERKEN, H. und
V. NEUHOFF: Spectrofluorometrische Bestimmung des Einbaus von 6-Aminonicotinsäureamid in die oxydierten Pyridinnucleotide der Niere. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 187 (1964).
37. HERKEN, H., G. SENFT
und B. ZEMISCH: Die Einschränkung des tubulären Natrium- und Kaliumtransportes durch Biosynthese 6-Aminonicotinsäureamid enthaltender Nucleotide. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 249, 54 (1964).
38. HERKEN, H.: Pharmakologische Untersuchungen zum Problem der selektiven Vulnerabilität des Gehirns.
Arzneim.Forsch. (Drug Res.) 15, 707 (1965).
39. HERKEN, H.: Die Wirkung von Antimetaboliten auf den Zellstoffwechsel des Warmblüters.
„Der Internist“, 7. Jg., 8, 375 (1966).
40. HERKEN, H.,
G. SENFT und
B. ZEMISCH: Der Einfluß von 6-Aminonicotinsäureamid auf die Verteilung der Natrium- und Kaliumionen zwischen dem extra- und intracellulären Raum in der Leber und Skelettmuskulatur. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 364 (1966)
41. HERR, R.R.,
T.E. EBLE,
M.E. BERGY, and
H.K. JAHNKE: Isolation and characterization of streptozotocin. Antibiot. Ann. 1959-1960, New York Medical Encyclopedia, Inc., 1960, p. 236.
42. HERR, R.R.,
H.K. JAHNKE, and
A.D. ARGOUEDELIS: The structure of streptozotocin.
J. Amer. Chem. Soc. 89, 4808 (1967).
43. HESSLER, E.J.,
H.K. JAHNKE: Improved synthesis of streptozotocin.
J.of Organic Chem., Vol 35, No. 1, 245 (1970).
44. HOUSE, E.L.: A histological study of the pancreas, liver and kidney both during and after recovery from alloxan diabetes.
Endocrinology 62, 189 (1958).
45. HUGGETT, A.S.G, and
D.A. NIXON: Use of glucose oxidase, peroxidase and o-dianisine in determination of blood and urinary glucose.
Lancet 1957 II. 368.
46. JACOBS, H.R.: Hypoglycemic action of alloxan.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 37, 407 (1937).

47. JOHNSON, D.D.:
Alloxan administration in the guinea pig:
a study of the histological changes in the
islands of Langerhans, the blood sugar
fluctuations and changes in the glucose
tolerance.
Endocrinology 46, 135 (1950).
48. JUNGAS, R.L., and
E.G. BALL:
Studies on the metabolism of adipose tissue.
XII. The effect of insulin and epinephrine on
the free fatty acid and glycerol production in
the presence and absence of glucose.
Biochemistry (Wash) 2, 383 (1963).
49. JUNOD, A.,
A.E. LAMBERT, L. ORCI,
R. PICTET, A.E. GONET,
and A.E. RENOLD:
Studies of the diabetogenic action of
Streptozotocin (32401).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 201 (1967).
50. JUNOD, A.,
A.E. LAMBERT,
W. STAUFFACHER, and
A.E. RENOLD:
Diabetogenic action of streptozotocin:
Relationship of dose to metabolic response.
J. Clin. Invest. Vol 48, No. 11, 2129 (1969).
51. KALANT, N.,
TH. R. CSORBA, and
N. HELLER:
Effect of insulin on glucose production and
utilisation in diabetes.
Metabolism 12, 1100 (1963).
52. KAPLAN, N.O.,
A. GOLDIN,
S.R. HUMPHREYS,
M.M. CIOTTI, and
J.M. VERIDITTI:
Significance of enzymatically catalyzed
exchange reactions in chemotherapy.
Science 120, 437 (1954).
53. KUSHNER, B.,
M. LAZAR, M. FURMAN,
T.W. LIEBERMAN, and
I.H. LEOPOLD:
Resistance of rabbits and guinea pigs to the
diabetogenic effect of streptozotocin.
Diabetes 18, 8:542 (1969).
54. LAZAROW, A., and
S.L. PALAY:
Production and course of alloxan diabetes in
the rat.
J. Lab. Clin. Med. 31, 1004 (1946).
55. LEVINE, R.,
M. GOLDSTEIN,
S. KLEIN, and
B. HUDDLESTON:
The action of insulin on the distribution of
galactose in eviscerated nephrectomized dogs.
J. Biol. Chem. 179, 185 (1949).
56. LEVINE, R.,
M. GOLDSTEIN:
On the mechanism of action of insulin.
Recent Progr. Hormone Res. 11, 343 (1955).
57. LEWIS, C., and
A.R. BARBIERS:
Streptozotocin, a new antibiotic. In vitro and
in vivo evaluation.
Antibiot. Ann. 247 (1959-1960).
58. LILLIE, R.D.:
Histopathologic technic and practical
histochemistry.
3rd ed. Mc Graw-Hill, New York (1965).
59. LITTLE, A.D.:
The effect of streptozotocin (NSC 85 998) on
the structure and function of the islets of
Langerhans in the rat and hamster.
Ann. Rep. Cancer Chemo. National Service
Center, Section III,
Preclinical Toxicology, Sept. 1 (1966).
60. LOGE, O.:
Der chinesische Streifenhamster als Modell in
der Diabetesforschung.
Zschr. Versuchstierkunde 12, 93 (1970).

61. LOGOTHETOPOULOS, J., J.K. DAVIDSON, R.E. HAIST, and C.H. BEST: Degranulation of beta cells and loss of pancreatic insulin after infusions of insulin antibody or glucose. *Diabetes* Vol. 14, No. 8, 493 (1965).
62. LOGOTHETOPOULOS, J., G. BROSKY: Mitotic activity of islet cells in alloxan and streptozotocin diabetic mice studied by radioautographie. *Diabetes* 17, 306 (1968).
63. LOSERT, W., O. LOGE, K.D. RICHTER: Untersuchungen zur Insulininkretion an normalen spontandiabetischen, streptozotocindiabetischen und adrenaletomierten chinesischen Streifenhamstern. *Diabetologia* 6, 79 (1970).
64. LOSERT, W., W. KRAAZ: Unveröffentlichte Untersuchungen (1970).
65. LOWRY, O.H., N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR, and R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
66. LUKENS, F.D.W.: Alloxan diabetes. *Physiol. Reviews* 28, 304 (1948).
67. MALAISSE, W., F. MALAISSE-LAGAE, G.C. GERRITSEN, W.E. DULIN, and P.H. WRIGHT: Insulin secretion in vitro by the pancreas of the chinese hamster. *Diabetologia* 3, 109 (1967).
68. MAHLER, R., W.S. STAFFORD, M.E. TARRANT, and J. ASHMORE: The effect of insulin on lipolysis. *Diabetes* 13, 297 (1964).
69. MEIER, N., G. YERGANIAN: Spontaneous hereditary diabetes mellitus in the chinese hamster. III. Maintenance of a diabetic hamster colony with the acid of hypoglycemic therapy. *Diabetes* 10, 19 (1961).
70. MILNER, R.D.G., and C.N. HALES: The sodium pump and insulin secretion. *Biochim. Biophys. Acta* 135, 375 (1967).
71. MORGAN, C.R., and A. LAZAROW: Immunoassay of insulin using a two-antibody-system. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 111, 29 (1962).
72. MORGAN, C.R., and A. LAZAROW: Immunoassay of insulin: Two antibody system. *Diabetes* 12, 115 (1963).
73. MORGAN, C.R., R.L. SORENSON, and A. LAZAROW: Further studies of an inhibitor of the two antibody immunoassay system. *Diabetes* 13, 579 (1964).
74. MURRAY-LYON, I.M., A.L.W.F. EDDLESTON, R. WILLIAMS, M. BROWN, B.M. HOGBIN, A. BENNETT, J.C. EDWARDS, and K.W. TAYLOR: Treatment of multiple-hormone-producing malignant islet cell tumor with streptozotocin. *Lancet*, Vol. II, 895 (1968).
75. PARK, C.R., D.M. REGEN, and H.E. MORGAN: Characterization of sugar transport in muscle. *Fed. Proc.* 22 (Part I), 167 (1963).
76. PITKIN, R.M., and W.A. REYNOLDS: Diabetogenic effects of streptozotocin in rhesus monkeys. *Diabetes* Vol. 19, No. 2, 85 (1970).

77. RAKIETEN, N.
M.L. RAKIETEN, and
M.V. NADKARNI: Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37 917). Cancer Chemotherapy Rep. 29, 91 (1963).
78. REICHARD, G.A., Jr.,
A.G. JACOBS,
B. FRIEDMANN,
P.R. KIMBEL,
N.J. HOCELLA, and
S. WEINHOUSE: Effects of insulin and tolbutamide on production and utilisation of blood sugar. Metabolism 8, 486 (1959).
79. ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik, 15th ed. R. Oldenbourg, Munich, 1948.
80. SADOFF, L.: Effects of streptozotocin in a patient with islet cell carcinoma. Diabetes 18, 10:675 (1969).
81. SCHACHT, U.,
G. SCHULTZ und
G. SENFT: Catecholamin- und ATP-Gehalt der Nebennieren nach Gabe von 6-Aminonicotinsäureamid. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 355 (1966).
82. SCHEIN, P.S.,
D.A. COONEY, and
M.L. VERNON: The use of nicotinamide to modify the toxicity of streptozotocin diabetes without loss of antitumor activity. Cancer Res. 27:1, 2324 (1967).
83. SCHEIN, P.S., and
R.W. BATES: Plasma glucose levels in normal and adrenalectomized mice treated with streptozotocin and nicotinamide. Diabetes 17, 760 (1968).
84. SCHULTZ, G.,
G. SENFT, W. Losert und
U. SCHACHT: Zum Mechanismus der 6-Aminonicotinsäureamid-Hyperglykämie. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 253, 345 (1966).
85. SCOTT, H.R.: Rapid staining of beta cell granules in pancreatic islets. Stain Technology 27/5, 267 (1952).
86. SENFT, G.,
W. LOSERT,
J. Mc EVOY und
H. KAESS: Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von 6-Aminonicotinamid und 2,4-Dinitrophenol auf den Natrium- und Kaliumtransport verschiedener Gewebe. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 255, 388 (1966).
87. SIMS, E.A.H.,
B.R. LANDAU: Diabetes mellitus in the chinese hamster. I. Metabolic and morphologic studies. Diabetologia 3, 115 (1967).
88. SITT, R., W. LOSERT,
G. SCHULTZ, H. KAESS
und G. SENFT: Der Einfluß von Insulin auf den Kaliumtransport in der Skelettmuskulatur. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 255, 398 (1966).
89. STAUFFACHER, W.,
I. BURR,
A. GUTZEIT,
D. BEAVEN,
J. VELEMINSKY, and
A.E. RENOLD: Streptozotocin diabetes: Time course of irreversible B-cell damage; further observations on prevention by nicotinamide (34439). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 194 (1970).
90. STEELE, R.,
J.S. BISHOP, A. DUNN,
N. ALTSZULER,
I. RATHGEB, and
R.C. DEBODO: Inhibition by insulin of hepatic glucose production in the normal dog. Amer. J. Physiol. 208, 301 (1965).

91. STEINER, D.F.,
V. RAUDA, and
R.H. WILLIAMS: Severe ketoacidosis in the alloxan diabetic rat.
Endocrinology 68, 809 (1961).
92. VAVRA, J.J.,
C. DE BOER, A. DIETZ,
L.J. HANKA, and
W.T. SOKOLSKI: Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic.
Antibiot. Ann. 230 (1959-60).
93. WEBER, E.: Grundriß der biologischen Statistik.
S. Fisch. Verlag, Stuttgart, 501 (1967).
94. WEBER, G.: Study and evaluation of regulation of enzyme
activity and synthesis in mammalian liver.
Advances in Enzyme Regulation 1, 1 (1963).
95. WEBER, G.,
R.L. SINGHAL,
N.B. STAMM,
E.A. FISHER, and
M.A. MENTENDIEK: Regulation of enzymes involved in gluco-
neogenesis.
Advances in Enzyme Regulation 2, 1 (1964).
96. WEBER, G.: Insulin: Suppressor of biosynthesis of hepatic
gluconeogenic enzymes.
Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 96 (1965).
97. WEINHOUSE, S.,
A. FRIEDMAN, and
G. REICHARD: Effects of insulin on hepatic glucose production
and utilisation.
Diabetes 12, 1 (1963).
98. WEISBERG, H.F.,
A. FRIEDMAN, and
R. LEVINE: Inactivation or removal of insulin by the liver.
Amer. J. Physiol. 158, 332 (1949).
99. WHITE, F.R.: Streptozotocin.
Cancer Chemother. Rep. 30, 49 (1963).

Herrn Prof. Dr. med. M. Kramer danke ich recht herzlich für die Überlassung des Themas und für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ganz besonderen Dank sage ich Herrn Dr. med. W. Losert, der mir infolge seines großen Wissens wertvolle Hinweise für die Gestaltung der vorliegenden Arbeit gab.

Dankbar bin ich auch Herrn Dr. Richter und der Schering AG Berlin.

Lebenslauf

Am 7.2. 1943 wurde ich, Andrad Rilke, als einziger Sohn des Fotochemikers Oswald Rilke und seiner Ehefrau Käthe, geb. Müller, in Berlin geboren. Im Mai 1945, während der letzten Kriegshandlungen, fiel mein Vater.

Nach vier Jahren Grundschule besuchte ich das Gymnasium zum Grauen Kloster, das mir eine humanistische Ausbildung vermittelte. Meine Reifeprüfung legte ich 1962 ab und studierte dann an der Freien Universität Berlin elf Semester Medizin. Am 27.9.1968 bestand ich das medizinische Staatsexamen. Danach war ich als Medizinalassistent im Behring- und St. Gertraudenkrankenhaus sowie an der Privatklinik Dr. Lubinus tätig. Seit November 1969 arbeitete ich bei der Firma Schering AG Berlin.

Im Februar 1970 wurde ich approbiert und begann anschließend meine Weiterbildung zum Facharzt für innere Medizin.

